الجمهورية العربية السورية

وزارة التعليم العالي

جامعة دمشق-كلية الزراعة

قسم علوم البستنة

التوصيف الجزيئي لبعض أصناف وطرز المشمش في سورية

Molecular Characterization of Some Apricot Varieties and Genotypes in Syria.

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في علوم البستنة

إعداد

صبا ياسين سرحان

إشراف

المشرف العلمي

د.رولا بايرلي

كلية الزراعة -جامعة دمشق

المشرف المشارك

د. عبد الله الطاهر

الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية

2009

إهداء

إلى من أورثني اسمه بعدما كنت نسياً منسياً

إلى من أفنى عمـره ليمنحني حلمـاً ورديـاً

إلى من سيبقى لـي قدوة ومثـلاً أبديـاً

إلى روح أبي الطاهرة

كلمة شكر

لجنة الحكم الأستاذ الدكتور فيصل حامد والدكتور نزار مير علي لتقييمهما للبحث وإغنائهما له، و للدكتورة روлا بايرلي في قسم علوم البستنة في كلية الزراعة لتكرمها بالإشراف والتحكيم.

الدكتور عبد الله الطاهر في قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية لتكرمه بالإشراف والمساعدة في كافة مراحل العمل والكتابة.

الدكتور أحمد عبد القادر للمساعدة في تسهيل أمور العمل في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وجميع الزملاء في قسم التقانات الحيوية: المهندس أنس خنشور والمهندسة نيلة علي باشا والمهندسة نور الأسعد للمساعدة في إنجاز هذا العمل.

أساتذة كلية الزراعة لتسهيل إنجاز هذا البحث وأخص بالشكر الأستاذ الدكتور عبد العزيز الصباغ و الأستاذ الدكتور حمزة بلال عميد كلية الزراعة.

المهندسة إيمان مطر في قسم البستنة في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية للمساعدة في تحديد الأشجار وتقديم النصائح في التوصيف الشكلي للأصناف المدروسة، وكذلك الدكتور علاء خوية والمهندس عامر جنيدان والمهندس سامر لبابيدي في إيكاردا للمساعدة في برامج التحاليل الإحصائية.

و كل الشكر والامتنان لوالدتي الحنون على دعواتها ورعايتها لولدي ودعمها المعنوي و فضلها الذي غمرني طوال حياتي.

الشكر الجزيل لزوجي العزيز المهندس حسام القاعوري على دعمه ومساندته وعطائه المستمر لدفعي إلى النجاح دوماً.

إلى إخوتي وأخواتي وبراعم عائلتنا و إلى جميع الأهل والأصدقاء جزيل الشكر والعرفان على ما قدموه لمساندتي.

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في علوم البستنة من كلية الزراعة بجامعة دمشق.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirement for the degree of master of Horticulture science at the Faculty of Agriculture, Damascus University.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2009/8/12 وأجيزت.

لجنة الحكم:

الأستاذ الدكتور فيصل حامد في قسم علوم البستنة-كلية الزراعة جامعة دمشق(عضواً)

الدكتور نزار مير علي مدير بحوث ورئيس قسم البيولوجيا الجزيئية والتقانة الحيوية في هيئة الطاقة الذرية (عضواً)

الدكتورة رولا بايرلي في قسم علوم البستنة-كلية الزراعة جامعة دمشق (عضواً مشرفاً).

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة نتيجة بحث علمي قامت به المرشحة (صبا ياسين سرحان) تحت إشراف الدكتورة (رولا بايرلي) في قسم علوم البستنة-كلية الزراعة-جامعة دمشق، والدكتور (عبد الله الطاهر) في قسم التقانة الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية، وأي مراجع أخرى بحثت في هذه الرسالة موثقة في النص.

المرشح	المشرف المشارك	المشرف العلمي
صبا ياسين سرحان	الدكتور عبد الله الطاهر	الدكتورة رولا بايرلي

Certficate

It is hereby certificated that the work described in this thesis is the result of the author`s own investigations under the supervision of Dr. Roula Bayrely ,Horticulture Department, Faculty of Agriculture, Damascus University, and Dr. Abdullah Altaher, Biotechnology Department, of the General Commission for Scientific Agricultural Research, and any references to other research work has duly acknowledged in the text.

Supervision	Co-supervision	Candidate
Dr.Roula Bayrely	Dr. Abdullah Altaher	Seba Yassin Sarhan

تصريح

أصرح بأن هذا البحث (التوصيف الجزيئي لبعض أصناف وطرز المشمش في سورية) لم يسبق أن قبل للحصول على أي شهادة. ولا هو مقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشحة

صبا ياسين سرحان

Decleration

It is hereby declared that this work (Molecular Characterization of Some Apricot Varieties and Genotypes in Syria) has not been accepted for any degree yet, nor it has been submitted concurrently for any other degree.

Candidate
Seba Yassin Sarhan

الفهرس

فهرس الأشكال

فهرس الجداول

الملخص

تم إجراء هذا البحث في قسم التقانات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وفي قسم علوم البستنة في كلية الزراعة– جامعة دمشق بهدف تحديد التشابه الوراثي بين ستة أصناف من المشمش وهي: الشكربارا، التدمري، البلدي الماوردي، البلدي الحبي، الوزري، العجمي بالإضافة إلى خمسة طرز للأصل الكلابي للمشمش K1,K2,K3,K4,K5 استخدم في هذا البحث تقنيتن معتمدتين على تقانة PCR وهما تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) و تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النقّالة (IRAP) حيث تم استخدام 26 زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة SSR والمطورة من مكتبة الجينوم في الدّراق و 33 زوجاً من المرئسات الخاصة بالعناصر النقّالة مشتقة من الشعير والموز.

أوضحت النتائج أن هناك 22 زوج من أزواج المرئسات المستخدمة في تقنية SSR ذات فعّالية كبيرة في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة بنسبة تعددية شكلية92.3% حيث تم الكشف عن78 أليل بمتوسط 3 أليل/موقع ،وبلغت قيمة متوسط التغاير المورثي المتوقعة 0.48 وقيمة التغاير المورثي الملحوظة0.29، بينما كشفت نتائج تقنية IRAP أن هناك 32 زوج من أزواج المرئسات المستخدمة ذات فعالية كبيرة في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة بنسبة تعددية شكلية74.4%.

أظهرت تقنية SSR أعلى درجة قرابة وراثية بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي (0.69) و أقل درجة قرابة وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي والعجمي (0.27)، بمتوسط درجة قرابة 0.48 بين كافة الأصناف والطرز المدروسة، كما أظهرت تقنية IRAP أعلى درجة قرابة وراثية بين الطرازين K4 وK5 (0.78) و أقل درجة قرابة وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي والوزري (0.55)، بمتوسط درجة قرابة0.67 بين كافة الأصناف والطرز المدروسة.

كما وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية SSR أصناف وطرز المشمش المدروسة في عنقودين رئيسين على درجة تشابه0.43 و جاءالصنفين البلدي الماوردي والعجمي مستقلين عنهما كل على حده حيث بقي هذا الأخير متميزاً عن المجموع ،احتوى العنقود الأول ستة أصناف ويمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين :تضمن الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري بالإضافة للطرازين K3 وK1 واحتوى تحت العنقود الثاني الصنف التدمري مع الطراز K2 واحتوى العنقود الرئيسي الثاني كل من الطرازين K4 وK5 والصنف شكربارا .

ووزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية IRAP أصناف وطرز المشـمش المدروسـة إلـى عنقودين رئيسين انفصل عنهما الطراز K1 و الصنف العجمي كل على حده والبلدي الماوردي بقي متميزاً عن المجموع، احتوى العنقود الأول ستة أصناف وأمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين احتوى تحت العنقود الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري أما الثاني فقـد شـمل الصـنف التدمري مع الطراز K3 والصنف شكربارا والطراز K2 كل على حده أما العنقود الرئيسي الثاني فشمل الطرازين K4 وK5.

تمكنت تسعة أزواج من المرئسات المستخدمة في تقنية SSR من وسـم بعـض الأصـناف والطرز المدروسة بـ14 ألليل فريد حيـث تميـز الصـنف العجمـي بـأعلى عـدد مـن الواسمات(5)،بينما استطاعت تقنية IRAP تمييز أربعة من الطرز الوراثيـة الخمـس مـن المشمش الكلابي وجميع الأصناف المدروسة بـ 35 واسم فريد حيث تميز الصـنف البلـدي الماوردي بأعلى عدد من الواسمات(10).

أثبتت تقنيتا SSR وIRAP فعالية في كشف التباينات الوراثيـة بـين الأصـناف والطـرز المدروسة وكذلك تمييزها بشكل واضح، وبالتالي إمكانية اعتماد هاتين التقنيتين في التوصيف الجزيئي للأصناف بهدف تعريف المصادر الوراثية المحلية ، وتقييم المجمعات الوراثية.

المقدمة Introduction

تحتل شجرة المشمش المرتبة الثالثة عالمياً من الناحية الاقتصادية بعد الدّراق والخوخ بين أشجار الفاكهة ذات النّواة الحجرية، لذا فقد انتشرت زراعتها حول العالم في المناطق المعتدلة، وشبه الاستوائية (Maghuly *et al.*,2005) ، وخصوصاً في منطقة حوض المتوسط والتي تنتج أكثر من 80% من الإنتاج العالمي للمشمش (Fideghelli *et al.*, 1999) والذي بلغ3067952 طن عام 2007 بمساحة بلغت 466056 هكتار(FAO, 2007).

أما في القطر العربي السّوري، فقد قدرت المساحة المزروعة بالمشمش لعام 2008 بحوالي 13561 هكتار مزروعة بحوالي 3052.8 ألف شجرة مشمش أنتجت حوالي 100902 طن. وتنتشر زراعة هذه الشجرة في معظم المحافظات حيث تحتل محافظة ريف دمشق المرتبة الأولى من حيث المساحة وعدد الأشجار والإنتاج تليها محافظة حمص، ثم ادلب فمحافظة اللّاذقية (المجموعة الاحصائية الزراعية السنوية ،2008).

ولقد بوشر بزراعة هذه الشجرة منذ القدم حيث انتشرت زراعتها من الصين ووسط آسيا إلى الهند وشمال إفريقيا والأقطار العربية وخاصة سورية ويعد موطن النشوء لهذه الشجرة المناطق الشرقية من بلاد الصّين الغربية أما الأصناف المقاومة للصّقيع الشتوي فيرجع موطنها الأصلي إلى سيبيريا (القطب وقطنا، 1988).

تعود معظم الأصناف المزروعة عالمياً من المشمش للجنس *Armeniaca*، تحت العائلة Prunoidea والعائلة الوردية Rosaceae (حامد والعيسى،1990).

ويختلف أصل المشمش ومنشؤه في القطر العربي السوري، فالأصناف التي نمت في غوطة دمشق منذ القدم وتأقلمت مع الظروف البيئية وتميزت بمجموعة من الصفات المرغوبة عرفت بأسمائها المحلية، وتوارثها الآباء عن الأجداد، وهي بدورها تعد مصدراً أساسياً للتنوع الحيوي، ومستودعاً لكثير من المورثات التي يمكن الاستفادة منها في برامج التربية والتحسين الوراثي، لذا كان من الضروري تحديد الأصناف والطرز الوراثية المتميزة بصفات مرغوبة، والاستفادة منها في عملية التحسين الوراثي وإكثار الأصناف المتميزة -منها والمهددة بالانقراض مثل الصنف البلدي(حامد والعيسى،1990) المتأقلم مع الظروف المناخية المحلية.

وعلى الرغم من الجهود التي بذلت في مجال التوصيف الشكلي لهذه الأصناف والذي يعد أحد الدعامات الأساسية التي تم الاعتماد عليها قديماً في تمييزالأصناف إلا أن طرائق التوصيف الشكلي تحتاج إلى وقت طويل، كما أنها تتأثر بالظروف البيئية والأطوارالفينولوجية للنبات مما يؤدي إلى عدم ثبات القراءات لذلك يجب دعم هذه الطرائق بالطرائق الحديثة التي تعتمد

على التوصيف الجزيئي (Ricciardi *et al.*, 2002)، تستخدم لذلك العديد مــن المعلّمــات الجزيئية مثل تباين أطــوال القطــع المحــددة RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism)، وتقنية الدنا المتعدد الأشكال المضـــخم عشـــوائياً RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)، وتقنية تكراريـــات التسلســـلات البســـيطةSSR (Simple Sequence Repeats).

أصبحت معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطةSSR الأداة المستخدمة في تعريف العديد مــن الأنواع النباتية في الوقت الراهن لأنها تعتمد على تفاعل البلمــرة المتسلســل (PCR) وذات تكرارية عالية، متعادلة السيادة وذات تعددية شكلية في جينوم النبات (Powell *et al.*,1996) إضافة إلى أنها في العديد من الحالات تعد ثابتة بين الأنواع وهذا مـــا يجعلهـــا ذات قابليـــة للانتقال بين الأنواع المتقاربة (Huang *et al.*, 1998) وبالمقارنة مع التقنيات المعتمدة على الدنا DNA فإن تقنية تكراريات التسلسلات البسيطةSSR هي التقنية الأكثر فاعلية وفائدة في دراسات التنوع الوراثي (Zhebentyayeva *et al.*, 2003; Hormaza, 2002; Romero *et al.*, 2003; Regner *et al.*, 2004).

اكتشف Kalender وآخرون عام 1999 طريقة جديدة تعتمد على العناصر النقّالــة فـــي الجينوم حيث يتم تضخيم قطع الدنا (DNA) المتوضعة بين موقعي إدخال للعناصـــر النقّالـــة وذلك باستخدام زوج من المرئسات يرتبط بـــالتكرارت الطرفيـــة الطويلـــة LTRs (Long terminal repeats) الموافقة لهذا الموقع وأطلق عليها اسم تقنية التعددية الشكلية المضـــخمة بـــين مواقـــع إدخـــال العناصـــر النقّالـــة Inter-Retrotransposon Amplified (polymorphism) والتي استخدمت بكفاءة عالية في رسم الخرائط الوراثية وبرامج التربية والانتخاب ودراسات التنوع الوراثي (Darius, 2005).

وانطلاقاً من ذلك أجريت هذه الدراسة بهدف التوصيف الجزيئي لبعض الأصـــناف المحليـــة للمشمش، و الطرز الوراثية للأصل الكلابي بالإضافة لتحديد درجة التشابه الوراثية فيما بينها.

أهداف البحث

➢ يهدف هذا البحث إلى:

1- التوصيف الجزيئي لبعض أصناف المشمش وطرز الأصل الكلابي للمشـــمش المنتشرة في سورية باستخدام بعض المؤشرات الجزيئية (SSR, IRAP).

2- حساب درجة التنوع الوراثي بين الأصناف والطرز المدروسة و تحديد درجة التشابه الوراثية بينها اعتماداً على المعطيات المأخوذة مــن التحليــل باســتخدام المؤشرات الجزيئية.

الفصل الأول

الدراسة المرجعية

Literature review

الدراسة المرجعية

Literature review

يعد المشمش نباتاً اقتصادياً هاماً في العائلة الوردية مما نحى بالعديد من العلماء لتوصيفه شكلياً ودراسة عدد من أصنافه وطرزه وذلك لكونه يحوي على اختلافات وصفية بين الأنماط السائدة من الأشجار والثمار يضاف لها الصفات الفيزيائية الهامة مثل فترة السكون الشتوي والتوافق الذاتي والمقاومة للأمراض، لذا وخلال العقود الأخيرة حاول العلماء استخدام شبيهات الأنزيمات (Isozyme) كمعلّمات بيوكيميائية لدراسة التغاير الوراثي في المشمش(Byrne and Littleton,1989; Battistini and Sansavini,1991; Badenes *et al.*,1996) إلا أن تحاليل شبيهات الأنزيمات لم تكشف عن تعددية شكلية عالية لتعريف كل الأصناف وتوضيح العلاقات فيما بينها، ومع التطور الكبير في استخدام المعلّمات الجزيئية المعتمدة على الاختلاف على مستوى المادة الوراثية DNA لتحديد البصمة الوراثية للنباتات المزروعة وأصولها البرية وذلك لما لهذه المعلّمات من ميزات كثيرة مثل كثرة عددها وعدم ارتباطها بالأطوار الفينولوجية للنبات وعدم تأثرها بالظروف البيئية على عكس المعلّمات الشكلية والبيوكيميائيّة وخاصة في النباتات الخشبية المعمرة (Wunsch and Hormoza, 2002) توفرت إمكانية جديدة لتقييم التنوع الوراثي بين جينوم النباتات (Karp *et al.*, 1996) ولهذا السبب استخدمت العديد من المعلّمات الجزيئية مثل التباين في أطوال القطع المضخمة(AFLP) وتقنية الدنا المتعدد الأشكال المضخم عشوائياً(RAPD) و تكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) في رسم الخرائط الوراثية وفي كشف وتحديد العديد من المورثات (Gene tagging) وكشف المورثات المنقولة من أنواع غريبة. أما الاستخدام الأكثر انتشاراً فهو التوصيف الجزيئي للمجمعات الوراثية وإيجاد التشابه الوراثي بين الأنواع والأصناف (Rajapakse, 2003 ; Gomez *et al.*, 2005).

أولاً- تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR: (Microsatellite, Simple Sequence Repeat)

عرف Khal في عام 2001 مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة (Microsatellite) بأنها تتابعات ترادفية لسلسلة قصيرة من القواعد الآزوتية ذات أطوال بين 2 و 10 أزواج قاعدية ذات تكرارية متوسطة ومرتبة ترادفياً، توجد بشكل كبير وبتسلسلات ذات طبيعة متغايرة في المادة الوراثية للفطور والنباتات والحيوان والإنسان وهي أحد صفوف المادة الوراثية المتكررة Repetitive DNA (Tautz and Rentz, 1984 ; Tautz, 1989)، ويعود التباين في مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة إلى تباين عدد نسخ أو عدد مرات تكرار الوحدات التكرارية الثنائية أو الثلاثية أو الرباعية في الجينوم من 5 إلى 50 نسخة مثل (AT)29 أو

(CAC)16 أو (GACA)32 وهي تتواجد بغزارة في النبات وتوجد مرة كل 6-7 آلاف زوج قاعدي (Cardel *et al* .,2000).

تحاط مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة من جانبيها بتسلسلات نيكليوتدية، عادة ما تكون فريدة ومحددة للنوع أو الجنس، وبالاعتماد على هذه التسلسلات يمكن تصميم مرئستين متخصصتين إحداهما مكملة لهذه التسلسلات الفريدة على إحدى سلسلتي الدنا والمرئسة الأخرى مكملة لهذه التسلسلات الفريدة على السلسلة الأخرى بحيث يكون اتجاه كلا المرئستين نحو داخل مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة وذلك لتضخيمها.

ونظراً لاختلاف عدد نسخ الوحدة التكرارية في مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة على الجينوم بين المدخلات المدروسة فإن نواتج تضخيم تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وباستخدام مرئستين متخصصتين بالموقع تكون بأطوال مختلفة وعليه يمكن فصل وتحديد منتجات التضخيم المختلفة الأطوال على هلامة الآغاروز أو الميتافور أو الأكريلاميد.

ويمكن تحديد مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة بعدة طرق مثل البحث ضمن قواعد بيانات الدنا مثلEMBL and Genebank أو من خلال معرفة التتابع النيكلوتيدي لقطع صغيرة من الدنا (200-600 زوج قاعدي) (Powell *et al*.,1996).

أصبحت معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة هي المعلّمات الوراثية المختارة لتحديد البصمة الوراثية في أنواع نباتية عديدة (Tautz, 1989) وذلك لأن هذه المعلّمات تعتمد على تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل PCR وذات تباين وتكرارية عالية وعادة ما تكون متعادلة السيادة وموجودة بغزارة ضمن المادة الوراثية لحقيقيات النوى (Powell *et al*., 1996; Gupta and Varschney, 2000).

استخدمت تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة في توصيف معظم أنواع الفاكهة، وكذلك في دراسات التنوع الوراثي، وتحديد درجة التشابه الوراثية. حيث طبقت على نطاق واسع في رسم الخرائط الوراثية وتحليل البنية الوراثية للجماعات (Barreneche *et al*., 1998). واستخدمت بشكل واسع في العائلة الوردية (Rosaceae) وكانت بداية على التفاح لتوصيف مصادر التفاح الوراثية وذلك من قبل Hokanson ورفاقه في عام 1998، وكذلك بين مجموعة من أصناف الأجاص (Kimura *et al*., 2002) ، وبين أصناف السفرجل (Yamamoto *et al*., 2004) ، وفي توصيف و تحديد درجة التشابه بين مجموعة من أصناف التفاح والأجاص (Bassil *et al*., 2006).

استطاع Cipriani ورفاقه في عام1999 تحديد سبعة عشر زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة التي تم عزلها وتحديد تتابعها من مكتبتي الجينوم للدراق واللتين تعدان

غنيتين بتتابعات AC/GT وAG/CT وبتطبيقها على عشرة طرز وراثية من الدّراق والنكتارين أظهرت خمسة عشر من المواقع(نسبة88%) تعددية شكلية, وبمعدل 2-4 قرين لكل موقع وكان متوسط التغاير المورثي لكل المواقع 0.32 والتي تعد قيمته أكثر معنوية من تلك التي أظهرتها شبيهات الأنزيمات والمعلّمات الجزيئية الأخرى (RFLP، RAPD). كما أعطت أزواج المرئسات العشرة السابقة نتائج تضخيم إيجابية عندما طبقت على أنواع مختلفة من الجنس *Prunus sp* (الخوخ الأوروبي، الخوخ الياباني، المشمش ، اللوز، الدّراق، النكتارين، الكرز الحلو والكرز الحامض) كما أعطت ثلاثة أزواج من المرئسات نتائج مماثلة في التفاح (*Malus. sp*) مما بين القابلية العالية لانتقال معلّمات SSR بين الأنواع والأجناس(Cross-species transportability).

تمكن Testolin وآخرون عام 2000 من عزل وتحديد التتابعات لستة وعشرين موقع من تكراريات التسلسلات البسيطة Microsatellite مشتقة من مكتبة الجينوم للدراق كانت سبعة عشر منها هي نفس المواقع المحددة من قبل Cipriani ورفاقه عام 1999 و تسعة مواقع جديدة أخرى ثم استخدمت هذه المواقع للتمييز بين خمسين صنفاً من الدّراق والنكتارين فأظهرت كل المواقع تعددية شكلية تراوحت من 2-8 قرين للموقع الواحد وكان متوسط قيمة التغاير المورثي لكل المواقع 0.47 وأبدت هذه المجموعة من المواقع القدرة على تمييز كافة الأصناف المدروسة باستثناء الأصناف المختلفة بطفرة أو الأصناف التي يعتقد بأن لها نفس النسب، ولذلك أوصي باستخدام هذه المواقع كمؤشرات جزيئية لتحديد البصمة الوراثية للدراق.

قام Sosinski ورفاقه عام 2000 بتوصيف معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة في الدّراق (*prunus persica*) إذ أنه بعد فحص مكتبة الجينوم للدراق وجد أن تتابعات السيتوزين-ثيمين(CT) تظهر كل 100 ألف زوج قاعدي وتتابعات السيتوزين-أدنين(CA) تظهر كل 420 ألف زوج قاعدي أما تتابعات الأدنينين-غوانين-غوانين(AGG) فتظهر كل 700 ألف زوج قاعدي. وبعد تحديد التتابعات تمّ تصميم المرئسات المخصصة لتفاعل البلمرة المتسلسل وذلك لتضخم المنطقة الحاوية على تكراريات التسلسلات البسيطة وتقييم التعددية الشكلية بين ثمانية وعشرين صنفاً من الدّراق حيث أعطى كل زوج من المرئسات من 1-4 قرين لكل موقع.

صمم Lopes وآخرون عام2002 واحد وعشرين زوجاً من المرئسات لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة المشتقة من مكتبة الجينوم للمشمش (*Prunus armeniaca* L.) والتي استخدمت في دراسة 25 صنف من المشمش الأوربي فأعطت كل المرئسات تعددية شكلية

بمعدل 3-12 قرين للموقع وبالتالي كانت أكثر فاعلية من تقنيتي شبيهات الأنزيمات وتباين أطوال القطع المحددة (RFLP), ولدى دراسة التنوع الوراثي لهذه الأصناف تمكن أحد هذه الأزواج من تضخيم موقعين من تكراريات التسلسلات البسيطة وذلك نظراً لحدوث تضاعف للموقع بطولين مختلفين بسبب تتالي الطفرات.

استطاع Hormaza عام 2002 باستخدام سبعة وثلاثين زوجاً من المرئسات المطورة من أنواع مختلفة تابعة للجنس *Prunus* دراسة ثمانية وأربعين طرازاً وراثياً من المشمش ذات مواطن جغرافية مختلفة بهدف تمييزها وتوصيفها وتحديد العلاقات الوراثية بينها، أعطى واحد وثلاثون من هذه المرئسات تضخيماً صحيحاً وعشرون منها أعطت نماذج تضخيم قابلة للتكرار ذات تعددية شكلية في جميع الطرز المدروسة حيث تم الكشف عن اثنين وثمانين قريناً في عشرين موقعاً وبذلك تم التمييز بين الطرز المدروسة وبشكل واضح باستخدام أزواج المرئسات السابقة كما أظهرت النتائج قابلية انتقال معلّمات SSR بين الأنواع مما يسمح بحدوث تضخيم بين الطرز الوراثية المختلفة لنوع معين من أشجار الفاكهة باستخدام تتابعات مطورة من أنواع أخرى. وتبين أن تحليل القطاعات العنقودية (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages UPGMA) فصل الطرز الوراثية المدروسة وفقاً لموطن النشوء والنسب.

لدى فحص مكتبة الجينوم في الدّراق الغنية بالتتابعات النيكلوتيدية سيتوزين-ثيمين (CT) حدد Dirlewanger ورفاقه عام 2002a واحداً وأربعين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة وصممت أزواج مرئسات للمناطق المحيطة بتكراريات التسلسلات البسيطة ثم قيّمت هذه المرئسات على سبعة وعشرين صنفاً من الدّراق وواحد وعشرين صنفاً من الكرز الحلو فأعطت جميعها نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة في الدّراق وقد أعطت ستة أزواج من المرئسات (10%) نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة لعدة مواقع من تكراريات التسلسلات البسيطة في العينة الواحدة بينما أعطى ثلاثة وثلاثين زوجاً من المرئسات نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة في الكرز الحلو وقد أعطت ثمانية (20%) منها نواتج تفاعل بلمرة متسلسل مضخمة لعدة مواقع من تكراريات التسلسلات البسيطة في العينة الواحدة، ومن بين ثلاثة وثلاثين موقعاً مفرداً لتكراريات التسلسلات البسيطة في الدّراق والكرز الحلو أعطى ثلاثة عشر منها تعددية شكلية في كل من الدّراق والكرز الحلو وتسعة عشرآخر كان ذا تعددية شكلية في الدّراق فقط وواحد في الكرز الحلو فقط، تراوح عدد القرائن في كل موقع من 1 وحتى 9 للدراق ومن 1 حتى 6 في الكرز الحلو أما قيمة التغاير الموروثي تراوحت بين0.07 و0.79 للدراق وبين 0.39 وحتى 0.76 للكرز الحلو، أما متوسط قوة التمييز (Discrimination power) كانت 0.54 و0.72 للدراق والكرز على التوالي وبذلك تم

تمييز كل أصناف الدّراق والكرز الحلو باستخدام ثلاثة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة فقط. وتستخدم هذه المواقع الأكثر فعالية في تمييز المدخلات لأجل تحديد البصمة الوراثية للدراق والكرز الحلو بالمجمع الوطني الفرنسي وفي تحاليل التوافق الجيني (Synteny) في الجنس *Prunus*.

تتمة لدراساته السابقة درس Dirlewanger ورفاقه عام2002b إمكانية انتقال معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة بين الأنواع والأجناس والفصائل النباتية المختلفة حيث استخدمت أزواج المرئسات السابقة في دراسة التباين الوراثي في أنواع الجنس *Prunus* وهي الكرز الحلو *P.avium* mazzard والكرز الحامض *P.cerasus*، الخوخ الأوربي *P.domestica*، اللوز *P.amygdalus*، المشمش *P.armeniaca* وخوخ مايروبلان *P.cerasifera* Ehrh وأجناس أخرى تتبع الفصيلة الوردية وهي التفاح *Malus* والفريز *Fragaria* وكذلك أنواع أخرى لا تتبع الفصيلة الوردية وهي الكستناء*Castanea*، الجوز *Juglans* والعنب*Vitis*. أعطت 75.6% من المرئسات تضخيماً في كل أنواع الجنس *Prunus* و29.3%منها تضخيماً في كل الأنواع المدروسة من العائلة الوردية في حين أعطت 80.5%،43.9%،31.7 % من المرئسات تضخيماً في الكستناء، العنب والجوز على التوالي.

توصل Aranaza ورفاقه في عام 2002 لحقيقة تثبت أن تكراريات التسلسلات البسيطة هي معلّمات فعّالة ومؤثرة في التطبيقات الوراثية والتربوية في الدّراق وذلك من خلال تطوير خمسة وثلاثين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) من مكتبة الجينوم في الدّراق الغنية بتتابعات السيتوزين-ثيمين/الأدنين-غوانين (AG/CT) ولقد وجد أن أربعة وعشرين منها ذات تعددية شكلية عند اختبارها على أربعة عشر صنفاً من الدّراق وأحد عشر صنفاً من النكتارين، حيث ظهر ما مجموعه82 قرين(أليل) في المواقع ذات التعددية الشكلية، ووجد أنه كلما ازداد عدد التتابعات في المواقع كلما ازداد عدد القرائن المرتبطة بها كما تمكنوا من تمييز جميع الأصناف كل على حده ماعدا صنفين منها ولقد أثبتوا أن ثلاثة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) تعد كافية لتمييز أربعة وعشرين طرازاً من أصل خمسة وعشرين ونتيجة للتحليل العنقودي تجمعت كل أصناف النكتارين في عنقود منفرد بينما كانت أصناف الدّراق أكثر تغايراً من النكتارين.

عزل Testolin وزملاؤه عام2002 ستة وعشرين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة من مكتبتي الجينوم للدراق(*Prunus persica* L) والغنية بتتابعات الأدنين-سيتوزين/غوانين-ثيمين(AC/GT) والأدنين-غوانين/سيتوزين-ثيمين(AG/CT)على التوالي، ولقد تم فحص قابلية الانتقال للمعلّمات ضمن الجنس *Prunus* على أنواع تابعة للجنس *Prunus* وهي الدّراق، النكتارين، اللوز، المشمش، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو، الكرز

الحامض بالإضافة للتفاح. وكانت النتيجة أنه أكثر من نصف تكراريات التسلسلات البسيطة (52%) أعطت تضخيماً صحيحاً في كل أنواع الجنس *Prunus* حيث كان حجم قطع الدنا المضخمة ضمن مجال الحجم المتوقع منسجمة في عددها مع المستويات المعروفة من الصّيغة الصّبغيّة ولقد كان معدل التضخيم منخفضاً عند الأنواع ذات العلاقة الوراثية التطورية الأقل مع الدّراق مثل الخوخ الأوربي والياباني والكرز.

أما على نبات الكرز الحلو فقد تم توصيف ستة وسبعين طرازاً وراثياً باستخدام أربعة وثلاثين زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة والتي عزلت مسبقاً من الدّراق حيث أعطى أربعة وعشرون زوجاً منها تضخيماً في مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة وكان أربعة عشر زوجاً فقط ذات تعددية شكلية, تم انتقاء تسعة أزواج بحسب التعددية الشكلية ونوعية التضخيم واستخدمت هذه الأزواج والقرائن السبعة والعشرون الناتجة عنها لتحديد الهوية الوراثية لاثنين وسبعين طرازاً وراثياً من الكرز الحلو، استطاعت هذه المرئسات تحديد الهوية المميزة لثمانية وستين طرازاً ولكنها لم تستطع تمييز الطرز المطفرة من الطرز الأصلية، بلغ متوسط القرائن لكل موقع 3.7 بينما كانت القيمة المتوسطة للتغاير المورثي للمواقع التسعة المتعددة شكلياً0.49 وبالتالي أثبتت هذه النتائج الفائدة الناتجة عن قابلية انتقال معلّمات SSR بين الأنواع والتي تسمح بتمييز الطرز الوراثية المختلفة لأنواع أشجار الفاكهة باستخدام تتابعات مطورة من أنواع أخرى تتبع لنفس الجنس كما عكس تحليل القطاعات العنقودي UPGMA انقسام الطرز الوراثية القديمة المدروسة إلى مجموعتين مميّزتين بشكل واضح حسب الموطن الجغرافي لنشوئها(Wunsch and Hormaza, 2002).

ونظراً إلى أن رسم خرائط مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة يحتاج إلى زمن طويل وتكلفة مرتفعة إضافة إلى أن معظم هذه المواقع غير مرتبطة بشكل محدد مع مواقع المورثات المهمة سعى Wang ورفاقه في عام 2002 إلى الجمع بين تقنية رسم الخرائط القليلة التكلفة نسبياً وبين التحديد السريع لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة المعرّفة مسبقاً بواسطة تقنية AFLP في المناطق المهمة من الخريطة الوراثية وبفضل هذا الاتجاه تم تطبيق هذه الاستراتيجية لتحديد مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة المرتبطة بصفتين هامتين تورثان بسهولة في الدّراق وهما المقاومة لنيماتودا تعقد الجذور وصفة النمو الدائم(Evergrowing) كما تمكنوا من إثبات قابلية معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة بين أنواع الجنس ***Prunus*** الأخرى بما فيها المشمش.

في دراسة أجراها Romero وزملاؤه في عام2003 تم استخدام تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة بكفاءة عالية في توصيف وتمييز أربعين طرازاً وراثياً من المشمش ذات أصول جغرافية مختلفة وذلك باستخدام ستة عشر زوجاً من المرئسات الخاصة بمواقع تكراريات

التسلسلات البسيطة المختلفة والمشتقة أساساً من جينوم الدّراق. حيث كانت نسبة التغاير الموروثي 32%، لدى إجراء تحليل القطاعات العنقودية للطرز المدروسة انفصلت الطرز في مجموعات بشكل متوافق مع النسب وموطن النشوء.

عمد Zhebetyayeva وزملاؤه عام2003 إلى استخدام ثلاثين زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة المطورة من مكتبتي الجينوم للدراق في دراسة التباين الوراثي في سبعة وأربعين طرازاً وراثياً من المشمش فأعطى ثمانية عشر زوجاً من المرئسات تضخيماً لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة منها ستة عشر في نفس مجال الحجم الملحوظ في الدّراق واثنان مغايران, وأعطت بعض الأزواج تضخيماً لأكثر من موقع كما أظهر اثنا عشر زوجاً من المرئسات تعددية شكلية عالية لأربعة عشر موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة ، بينما كانت نتائج التعددية الشكلية عالية مقارنة بنتائج أنظمة المعلّمات الوراثية المتعادلة السيادة الأخرى مثل RFLP وIsozymes وكانت نسبة التنوع الوراثي للطرز الوراثية الأصلية في المجموعات البيئية التقليدية (القديمة) منخفضة لوجود نسبة عالية من التماثل الوراثي بين المجموعات (>0.75) بينما عكس تحليل القطاعات المتجاورة للمسافات الواقعة بين المعلّمات بين الأصناف المدروسة التاريخ المعقد لإدخال المشمش واستئناسه مما نتج عنه انفصال الأصناف في مجموعات لا تتوافق مع الأصل الجغرافي لها.

لدى تحديد أربعة وأربعين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة من مكتبة الجينوم للوز والغنية بتتابعات الأدنين– سيتوزين(AC) وتسعة وتسعين موقعاً من المشمش والغنية بتتابعات الأدنين –غوانين(AG) استطاع Messina وزملاؤه في عام 2003 من إثبات الكفاءة العالية لبرنامج تحديد المواقع المستخدم في المشمش حيث تم تحديد 99 موقعاً من أصل 127 موقعاً متوقعاً مقارنة مع اللوز(44 موقعاً من أصل 93 موقعاً متوقعاً) وبعدما تم تصنيع المرئسات الملائمة لعشرين موقعاً من كل من مكتبتي الجينوم وتطبيقها على ثمانية أنواع تتبع الجنس *Prunus* (اللوز، الدّراق، النكتارين، المشمش، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو والكرز الحامض) بالإضافة للتفاح *Malus domestica* تم إثبات قابلية الانتقال الواسعة لمعلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة SSR بين أنواع الجنس *Prunus* .

وفي دراسة مغايرة عما سبق قام Yamamoto وزملاؤه عام2003 بتحليل الأبوة للدراق الياباني باستخدام معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة حيث درس الأصل لستة عشر صنفاً من الدّراق (تسعة منها ربيت بالتهجين المتحكم به، اثنان منها كانت طفرات برعمية، وخمسة منها من بادرات) باستخدام سبعة عشر معلّماً من تكراريات التسلسلات البسيطة حيث تم إثبات العلاقات بين النسل والآباء في تسعة أصناف مهجّنة وذلك لأن قرائن تكراريات التسلسلات البسيطة قد انتقلت للأصناف من آبائها في كل المواقع المدروسة، وأثبتت هذه الدراسة تطور

بعض الأصناف من أصناف أصلية بالطفرة البرعمية بناءاً على التشابه في نمط انعزال مواقع التتابعات. كما أثبتت الدراسة أن بعض أصناف الدّراق غير معروفة النسب تشاركت بقرين واحد مع الأب الافتراضي في كل موقع لتكراريات التسلسلات البسيطة ولقد اقترحت الدراسة أن هذه الأصناف لم تكن طفرات ولكن ناتجة عن بادرات للأب الافتراضي مما أكد فاعلية معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة في تحاليل الأبوة.

صمم Clarke وTobutt عام 2003 مرئسات بناءاً على واحد وعشرين موقعاً من تكراريات التسلسلات البسيطة والتي تم تحديدها من النوع *Prunus avium*(Napoleon) أظهر تسعة عشر زوجاً من المرئسات تعددية شكلية عند تحليل أربعة عشر صنفاً من الكرز الحلو بوجود من 2 إلى7 قرين لكل موقع ولقد أمكن استخدام ثلاثة أزواج من المرئسات لتمييز كل الأصناف المدروسة كما ضخم اثنا عشر زوجاً من المرئسات نواتج التفاعل في ثلاثة أصناف من الدّراق أعطت 7 منها تعددية شكلية.

استطاع Mnejja وزملاؤه عام 2003 تحديد خمسة وثلاثين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة ذات تعددية شكلية وذلك باستخدام مكتبة الجينوم للخوخ الياباني الغنية بتتابعات السيتوزين–ثيمين/أدنين–غوانين(CT/AG) وتصميم أزواج مرئسات متخصصة لهذه المواقع حيث ضخم 27 منها موقعاً منفرداً للزوج الواحد أما الثمانية المتبقية فضخمت أكثر من موقع واحد. لوحظ أيضاً مستوىً عالٍ من التباين الوراثي في مجموعة من ثمانية أصناف قد اختبرت بأزواج المرئسات السبعة والعشرين ذات الموقع المفرد حيث بلغ متوسط عدد القرائن لكل موقع 5.7 أما نسبة التغاير المورثي الملحوظة كانت0.73 وقوة التمييز 74%، كما لوحظ إمكانية انتقال 85%و78% من المعلّمات المدروسة إلى كل من الدّراق واللوز على التوالي.

بيّن Canli في عام 2004 الفاعلية العالية لمعلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة كأداة قيمة في عملية انتخاب الصفات و خاصة الكمية منها ورسم الخريطة الوراثية لأن هذه المعلّمات ذات تعددية شكلية مرتفعة وتورث وفقاً لمبدأ السيادة المتعادلة (Co-Dominant) و ذلك عند دراسته لخرائط الارتباط الوراثية في النسل الناتج من تهجين صنفين من أصناف الكرز الحامض رباعية الصّيغة الصّبغيّة وذلك باستخدام خمسة وأربعين زوجاً من المرئسات المحددة في التفاح، الدّراق، الكرز الحلو والكرز الحامض حيث استطاع تمييز سبعة عشر معلّماً ارتبطت بشكل قوي مع عدد من الصفات الكمية مثل وقت الإزهار ووزن الثمرة وتماوت المدقة.

تم تحديد التنوع الوراثي بين أربعة عشر صنفاً من الخوخ وستة أصناف Pluots (وهو هجين مفترض بين الخوخ *P. salicia* lindi والمشمش*P. armeniaca*) وصنف تجاري Plumcot بالإضافة لسبعة أصناف من المشمش لمعرفة فيما إذا كان المشمش يعد من أسلاف

أصناف Pluots أو الصنف Plumcot وباستخدام 28 معلّماً من تكراريات التسلسلات البسيطة منها 25 محددة في الكرز الحلو وثلاثة في الدّراق. أعطت 80%من المرئسات المحددة في الكرز تضخيماً في أصناف الخوخ و أصناف Pluots بعدد قرائن بلغ 100 قرين بمعدل 4.3 قرين لكل زوج من المرئسات مما أثبت قابلية الانتقال لمعلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة بين أنواع الجنس *Prunus*. وبتحليل القرائن الناتجة وجد أن 83% من القرائن التي ظهرت في أصناف Pluots تعود إلى الخوخ و12%من القرائن كانت مشتركة مع الخوخ والمشمش ولم يكن هناك أي قرين مشترك مع المشمش لوحده بينما في صنف Plumcot أظهرت نتائج التضخيم 49 قريناً منها 51% عائدة للخوخ و36% للمشمش و12% مشتركة مع الخوخ والمشمش. وبتحليل المخططات البيانية شكلت أصنافPluots و الخوخ قطاعاً بعيداً عن المشمش بينما توضع صنف Plumcot في فرع منفصل بين قطاعي المشمش والخوخ(Ahmad *et al.*, 2004).

استطاع Testolin ورفاقه عام 2004 اختبار التعددية الشكلية وقابلية الانتقال لعشرين معلماً من تكراريات التسلسلات البسيطة المصممة بناءاً على مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة من مكتبة الجينوم للّوز(*Prunus amygdalus* Batsch) والغنية بتتابعات الأدنين – سيتوزين(AC) على سبعة أنواع مختلفة تابعة للجنس *Prunus* هي الدّراق، النكتارين، المشمش، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو والكرز الحامض بالإضافة للتفاح حيث تراوحت قيمة التغاير المورثي المتوقعة بين 0.62 و0.89 وقد أعطت 30%من المرئسات تضخيماً واضحاً في أنواع الجنس *Prunus* كما أعطى زوجين من المرئسات تضخيماً في التفاح.

وفي دراسة أجراها Messina وآخرون عام 2004 تم تحديد تسعة وتسعين موقعاً لتكراريات التسلسلات البسيطة حددت من مكتبة الجينوم للمشمش (*Prunus armeniaca*) الغنية بتتابعات الأدنين–غوانين/ السيتوزين–ثيمين(AG/CT)حيث تم بعد ذلك اختبار التعددية الشكلية لعشرين موقعاً منها في ستة عشر صنفاً من المشمش فتراوح عدد القرائن لكل موقع من 2 وحتى 9 وكانت قيمة التغاير المورثي المتوقعة تتراوح بين0.26 و0.82 كما ظهرت قابلية الانتقال لمعلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة بين أنواع الجنس *Prunus* المختلفة (اللوز، الدّراق، النكتارين، الخوخ الأوربي، الخوخ الياباني، الكرز الحلو والكرز الحامض) حيث أعطت 20%منها تضخيماً واضحاً في كل الأنواع السابقة بينما لم تعط أي منها تضخيماً في التفاح.

استطاع Dirlewanger ورفاقه في عام 2004 مقارنة الجينوم بين سبعة أصناف مضاعفة الصّيغة الصّبغيّة تابعة للجنس*Prunus* (X=8) (اللوز، الدّراق، المشمش، الكرز، *P.*

ferganesis، *P. davidiana* و *P. cerasifera*) وذلك باستخدام خريطة المرجع للجنس *Prunus*(*Prunus* reference map) والتي تشمل 562 من المعلّمات الجزيئية القابلة للانتقال (RFLP ,SSR) بالإضافة لثلاثة عشرة خريطة مبنية على مجموعات أصغر من هذه المعلّمات واعتمدت المقارنة على تطابق المعلّمات (colinearity) حيث أظهرت النتائج المبدئية لمقارنة الخرائط بين التفاح والمشمش مستوىً عال من التوافق(synteny) بين الجنسين، كما تم اكتشاف مناطق وراثية محافظة بين جنس *Prunus* وجنس *Arabidopsis*. وبمقارنة بيانات الخرائط المختلفة أمكن تحديد مواقع المورثات الثمانية والعشرين الأساسية التي تؤثر على الصفات الإنتاجية الموجودة في الأنواع المختلفة للجنس *Prunus* وذلك من خلال دراسة 277 زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة في 101 من نباتات الجيل الأول الناتجة عن التصالب الثلاثي ضمن الجنس *Prunus* بين الخوخ الكرزي مع هجين اللوز والدّراق حيث ارتبطت المعلّمات بشكل قوي مع المورثات الأساسية المسؤولة عن الصفات الهامة (المقاومة للأمراض والحشرات، كمية الثمار، عدم التوافق الذاتي وغيرها) وهي بدورها تستخدم حالياً في عمليات الانتخاب بمساعدة معلّمات جزيئية (Marker assisted selection) في برامج التربية.

طبقت تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة للبحث عن معلّمات جديدة يمكنها أن تميز بين أصناف المشمش وأصناف الفريز التجارية ولإثبات أنها هي الطريقة الأسرع للتحكم بالنوعية وثباتية الصنف وذلك من قبل Bowley عام 2004 حيث درس ثمانية وأربعين صنفاً من الفريز، سبعة عشر صنفاً من توت العليق، أربعين صنفاً من الكرز الحلو، ستة عشر صنفاً من الكرز الحامض، تسعة أصناف من الخوخ الياباني، اثنين وسبعين صنفاً من الخوخ الأوربي، اثنين وستين صنفاً من الدّراق ، خمسة أصناف من النكتارين، خمسة أصناف من المشمش وستة أصول من الكرز وباستخدام مرئسات متخصصة لكل نوع تم التمييز بين معظم أصناف النوع بثلاثة أزواج من المرئسات فقط ما عدا أصناف الدّراق التي استلزم تمييزها عن بعضها استخدام سبعة أزواج من المرئسات المتخصصة وتم استنتاج أن البصمة الوراثية المعتمدة على تكراريات التسلسلات البسيطة ليست ملائمة لتحديد الطفرات الثانوية مثل التغير في لون الأزهار لكنها تعد وسيلة فعّالة للكشف عن الأصناف التجارية المغايرة للطراز الحقيقي أو المعتمد.

وفي دراسة أجراها Pedryc وزملاؤه في عام 2004 بهدف المقارنة بين تقنيتي تكراريات التسلسلات البسيطةSSR وشبيهات الأنزيماتisozyme في مجال التوصيف الجزيئي لستة وتسعين صنفاً من المشمش تمت الدراسة بداية باستخدام معلّمات شبيهات الأنزيماتisozyme والتي لم تعط تعددية شكلية كافية بين الأصناف المدروسة أو أن توحي بوجود علاقة بينها، أما

معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة المستنبطة من مكتبتي الجينوم للمشمش والدّراق فقد مكنت وباستخدام أربعة أزواج من المرئسات فقط من كشف تعددية شكلية بين الأصناف وتحديد العلاقات الوراثية بينها.

وفي دراسة قام بها Ohta وآخرون عام 2005 لتقييم التنوع الوراثي لخمسة عشر صنفاً من الكرز المزهر (Flowering cherry) باستخدام 85 من معلّمات SSR والمطورة من أنواع أخرى قريبة له وراثياً (الدّراق، الكرز الحلو والحامض) أعطت 29% من المعلّمات تضخيماً في كافة العينات المدروسة ولقد وجد أن التباين الوراثي في الكرز المزهر أعلى منه في الدّراق والكرز الحلو.

تمكن Maghuly وزملاؤه عام 2005 وباستخدام عشرة معلّمات من تكراريات التسلسلات البسيطة ذات التعددية الشكلية والمطورة من المشمش من دراسة التنوع الوراثي لاثنين وستين صنفاً من المشمش تم جمعها من مناطق مختلفة في وسط أوربا حيث تم الحصول على أربعة وثمانين قريناً بمعدل 8.4 قرين لكل موقع وكانت قيمة التغاير المورثي0.61 وبتحليل البيانات وفق برنامج التحليل العنقودي UPGMA المعتمد على المسافات الوراثية تجمعت المدخلات وفقاً للنسب كما أكدت هذه النتائج صحة نتائج التوصيف الشكلي وتحاليل تقنية الدنا المتعدد الأشكال المضخم عشوائياً(RAPD)التي أجريت سابقاً للأصناف نفسها.

في دراسة أخرى حدد Mnejja ورفاقه عام 2005 مجموعة جديدة تتألف من 47 موقع من تكراريات التسلسلات البسيطة مشتقة من مكتبة الجينوم للّوز والغنية بتتابعات السيتوزين-ثيمين/أدنين-غوانين(CT/AG) كانت 42 منها ذات تعددية شكلية عند دراستها على ثمانية أصناف من اللوز وواحد وثلاثين منها كانت ذات موقع واحد وكان متوسط عدد الألليلات في الموقع 6.6 ومتوسط التغاير المورثي الملحوظ 0.65 والمتوقع 0.76 مما دل على تنوع وراثي عالي وكذلك كانت قابلية انتقال هذه المعلّمات مرتفعة (83-100%) إلى أنواع مختلفة من الجنس *Prunus* مثل الدّراق، الكرز الحلو، الخوخ الياباني والمشمش.

ولمقارنة التوصيف الجزيئي باستعمال معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة مع التوصيف الشكلي في المشمش، قام Sanchez-Perez ورفاقه عام 2005a بتطبيق تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة باستخدام عشرة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة على أربعين صنفاً للمشمش جمعت من أوربا وأمريكا الشمالية وثلاثة عشر سلالة مرباة للمشمش وقاموا بدراسة عدة صفات حقلية مثل وقت الإزهار،النضج، التوافق الذاتي، لون الطبقة الجلدية واللب وحجم الثمرة. مكنت المعلّمات الجزيئية المعتمدة على تكراريات التسلسلات البسيطة من تمييز كافة الطرز الوراثية المدروسة وبناءاً على شجرة التشابه تجمعت الطرز في مجموعات محددة بحسب الأصل الجغرافي والنسب بينما أظهرت شجرة التشابه بالاعتماد على الصفات الحقلية

والشكلية أن الطرز قد تجمعت بحسب صفاتها الثمرية, وكان الارتباط ضعيفاً بين التوصيف الجزيئي والشكلي.

في دراسة أخرى عمل Sanchez-Perez عام 2005b على التوصيف الجزيئي لثمانية أصناف من المشمش وأربعة عشر خط تربية من برنامج تربية المشمش وثلاثة أصناف معتمدة حديثاً باستخدام سبعة عشر معلّماً من معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة المطورة من الدّراق حيث أعطى أربعة عشر منها تضخيماً ذو تعددية شكلية وتراوح عدد القرائن من 1 إلى 9 وكان متوسط عدد القرائن للموقع4.1 وبذلك أعطت النتائج تمييزاً جزيئياً لكل الطرز الوراثية حيث تجمعت كل الطرز في سبعة مجموعات رئيسية وفقاً لموطنها الأصلي والنسب، مما أعطى بدوره رؤية جديدة لتطبيقات أخرى في تصميم تهجينات جديدة في برامج تربية المشمش وحماية الأصناف المعتمدة حديثاً.

لتوصيف بعض المصادر الوراثية للمشمش في منطقة حوض البحر الأبيض المتوسط قام Guerriero ورفاقه عام 2006 بدراسة الصفات الزراعية والشكلية لمئة مدخل من المشمش مأخوذة من المجمع الوراثي في إيطاليا وكذلك تمت دراسة البصمة الوراثية لستة وخمسين مدخلاً من هذه المدخلات باستخدام أربعة مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة ذات تعددية شكلية عالية, ثم أجري التحليل العنقودي للمدخلات باستخدام نتائج التوصيف الشكلي في البداية وتمت إعادته باستخدام نتائج التوصيف الجزيئي وبمقارنة المخططات البيانية الناتجة تم استنتاج المواطن المحتملة والعلاقات الوراثية بين مجموعات المدخلات.

و قد تمت دراسة علاقات التشابه الوراثي واختبار التعددية الشكلية لمواقع تكراريات التسلسلات البسيطة بين خمسة وأربعين صنفاً من أصناف المشمش وذلك باستخدام أزواج من المرئسات المطورة من أربعة مصادر مختلفة من المشمش والدّراق وكانت النتيجة أن نسبة 90% من المرئسات المستخدمة قد ضخمت مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة في المشمش وأكثر من نصفها كانت ذات تعددية شكلية وقد ثبت أن استخدام عشرة أزواج من المرئسات كان كافياً لتشكيل بصمة وراثية مميزة لمعظم الأصناف المدروسة أما مخطط شجرة التشابه الناتج فقد فصل الأصناف المدروسة ضمن مجموعتين أساسيتين ضمت كل منهما تحت مجموعات عديدة، كما أكدت هذه الدراسة إمكانية انتقال معلّماتSSR بين أنواع الجنس الواحد(Ruthner *et al.*, 2006).

وبهدف توصيف مجمع وراثي للمشمش باستخدام تكراريات التسلسلات البسيطة عمد Foroni ورفاقه عام 2006 إلى استخدام اثني عشر زوجاً من المرئسات المقابلة لستة مواقع من تكراريات التسلسلات البسيطة لتوصيف 42 طراز من المشمش، حيث تم فصل نواتج التضخيم لتفاعل البلمرة المتسلسل PCR على هلامة الآغاروز 2%، وكانت النتيجة أن بعض

تكراريات التسلسلات البسيطة أظهرت مستوىً عالٍ من التباين الوراثي وتراوح عدد القرائن لكل موقع بين 4 و 11 وقد مكنت معلّمات SSR من دراسة العلاقات الوراثية بين الأصناف المدروسة وتحديد هوية كل منها.

لدراسة البنية الوراثية لثلاثة مجتمعات نباتية من المشمش البري (*Prunus armeniaca*) المنتشرة في إحدى ولايات الصين الغربية استخدم Tian-ming وآخرون عام2007 مجموعة من معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة فأثبتت هذه المعلّمات قابلية الانتقال بين أنواع الجنس *Prunus* وفعالية عالية في دراسات التنوع الوراثي للمشمش البري حيث أظهرت الدراسة أن مجمعات المشمش البري ما زالت محافظة على مستوى عالٍ نسبياً من التباين الوراثي والذي يكمن بين أفراد المجتمع الواحد (83.6-86.3%) كما ظهر تباين بين المجتمعات المختلفة، وأوضحت الدراسة أن المسافة الوراثية بين المجتمعات مرتبطة معنوياً بالمسافات الجغرافية بين المدخلات.

تم توصيف تسع عشرة سلالة من الدّراق غير معروفة النسب في اسبانيا وذلك لمعرفة التنوع الوراثي بينها ولتوضيح علاقاتها المحتملة مع عشرة أصناف تقليدية من الدّراق وذلك باستخدام عشرين زوجاً من المرئسات المطورة من الدّراق وذات التعددية الشكلية العالية وكانت النتيجة الحصول على ستة وأربعين قريناً بمعدل 1 إلى 6 قرائن وبمتوسط 2.3 قرين للموقع و كانت أربعة عشر من مواقع تكراريات التسلسلات البسيطة ذات تعددية شكلية في الطرز الوراثية المدروسة كما ساعد رسم شجرة التشابه الوراثي في ترتيب الطرز الوراثية بحسب علاقاتها الوراثية(Bouhadida *et al*.,2007).

درس Zhang وزملاؤه عام 2008 الاختلافات الوراثية بين أربعة وأربعين مدخلاً من أحد الأنواع البرية للكرز Tomentosa (*Prunus tomentosa* thunb) جمعت من عشرة مناطق جغرافية-بيئية في المقاطعات الصينية الشمالية وسبعة مدخلات من ثلاثة أنواع متقاربة (*P. humilis* ,*P. japonica* ,*P. glandulosa*) وذلك باستخدام 110 من معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة المطورة من الدّراق، الكرز الحلو، الكرز الحامض والمشمش فأعطت 44 منها تضخيماً مما يعني أن نسبة 40% من هذه المعلّمات انتقلت إلى كرز Tomentosa والأنواع الثلاثة الأخرى ولقد تم الحصول على 250 قريناً بمعدل 5.68 قرين لكل موقع وبمتوسط تعددية شكلية فعالة 52%.استطاعت هذه النتائج إيضاح قدرة معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة على الانتقال من الأنواع المزروعة إلى الأنواع البرية للجنس *Prunus* وقدرتها على التمييز بين الطرز الوراثية. ولدى إجراء تحليل القطاعات العنقودي UPGMA لبيانات تكراريات التسلسلات البسيطة شكل كل من *P. humilis* و

P. japonica و *P. glandulosa* مجموعة واحدة بينما شكلت طرز *P. tomentosa* مجموعة منفصلة وقد توزعت الطرز ضمن المجموعة وفق موطنها الجغرافي.

درس Maghuly وزملاؤه عام 2008 التشابه الوراثي لأربعة وأربعين طرازاً وراثياً من المشمش من المجمعات الوراثية وذلك باستخدام عشرة أزواج من مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة والتي طورت مسبقاً من المشمش، أعطت كل المرئسات أنماط تعدديةٍ شكليةٍ توحي بوجود 85 قريناً مختلفاً، كان متوسط عدد القرائن لكل موقع 8.5 ولقد ظهر واحد وعشرون من هذه القرائن لمرة واحدة فقط في العينات المدروسة وتراوحت قيمة التغاير المورثي لكل موقع منفرد من 0.3182 إلى0.9545، أما تحليل القطاعات العنقوديUPGMA أدى إلى انفصال الطرز وفقاً للأصل الجغرافي إلى مجموعتين هما مجموعة الطرز ذات الأصل الأوربي ومجموعة طرز وسط آسيا مما أكد أهمية استعمال تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة لتحديد البصمة الوراثية لحماية الحقوق الفكرية لمربي النبات وأيضا للمساعدة في برامج تربية المشمش.

ثانياً-تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النقالةIRAP:

(Inter-Retrotransposon Amplified polymorphism)

يطلق تعبير transposons على العناصر الوراثية النقّالة (mobile genetic elements) ذات المقدرة على تغيير مواقعها في الجينوم وقد تم اكتشاف هذه العناصر النقّالة في النباتات العشبية قبل ما يقارب ستين سنة في الذرة الصفراء من قبل الباحثة McClintock عام (1948) وهي تشكل حوالي 80 %من جينوم بعض الأنواع المحددة مثل الذرة (Flavell *et al.*,1977; SanMingual *et al.*,1996) وتنتشرعادة على صبغيات النبات وهذا ينسجم مع أسلوب تضخمها، إلا أنها من الممكن أن ترتبط بمناطق محددة من الجينوم وتعمل لدى دخولها إلى الجينوم كعوامل مطفرة. وقد تغيرت النظرة إلى هذه العناصر الوراثية النقّالة من كونها عناصر أنانية(Selfish) أو طفيلية(parasite) بحسب رأي Orgel و Crick عام 1980 إلى أنها عوامل هامة في تطور جينوم النباتات بحسب Wessler ورفاقه عام 1995.

تقسم العناصر النقّالة إلى صفين: تدعى عناصر الصف الأول retrotransposons وهي التي تغير موقعها بالجينوم بطريقة النسخ و اللصق وباستخدام الحمض النووي الريبي (الرنا) كوسيط، بمعنى أنه يتم نسخ العنصر النقّال، ومن ثم لصق وإدراج النسخة الناتجة في موقع آخر من الجينوم مع بقاء النسخة الأصلية أو المانحة في مكانها من الجينوم. وهي تتكاثر نتيجة النسخ العكسي وإدخال نسخ جديدة من الحمض النووي DNA المكملة (complementary

DNA) (5-10 آلاف زوج قاعدي) إلى داخل الجينـوم وهـي شـبيهة جـداً بالفيروسـات القهقرية(Lentiviruses)(Flavell *et al.*, 1992)، في حين تدعى عناصر الصف الثـاني transposons وهي التي تغير موقعها بالجينوم بطريقة القطع و اللصق، بمعنـى أنـه يـتم استئصال العنصر النقّال من المنطقة الأصلية أو المانحة وثم لصقه في موقع آخر من الجينوم يدعى الموقع المستلم.

يمكن لهذه العناصر النقّالة أن تتضخم إلى أعداد هائلة من النسخ وأن تكون المساهم الأساسي في حجم الجينوم والتغيرات الوراثية إذ أنها تنتقل بين الأنواع وعبر الأجيـال مـن خـلال الانتقال العمودي والأفقي على التوالي.

وتقسم العناصر النقّالة بناءاً على الصفات البنائية إلى فوق العائلة والعائلة وتحت العائلة ومن أهم فوق العائلات للصف الاول retrotransposons هي العناصر النقّالـة ذات التكـرارات الطرفية الطويلةLTR وهي الأكثر غزارة في مغلفات البذور، أمثلة عن هذه العناصر تشـمل العناصر الشبيهة بالـ *Ty1/copia* و العناصر الشـبيهة بالـ *Ty3/gypsy* (Vitte and Panaud, 2005). إن بنية وآلية التكاثر لهذه العناصر تميزها كمعلّمات وذلك لأنها تحتـوي على تتابعات طويلة ومحددة وثابتة، يمكن استخدامها في استنساخ المعلّمات المحددة والتتابعات المحيطة بها كما أنها عناصر نشطة تكرارياً في عائلة retrotransposon تنـتج مـدخلات جديدة في الجينوم تؤدي لتعددية شكلية، كما أن هذه المدخلات الجديـدة يمكـن أن تكتشـف وتستخدم في ترتيب أحداث الإدخال مرحلياً في النسل وهذا بدوره يساعد في دراسـة تطـور السلالات(Alavia-Kia *et al.*, 2008).

نظراً لوفرة هذه العناصر النقّالة وقدرتها على إيجاد نسخ جديدة فقد تم تطوير عـدة تقنيـات لتحديد مواقع إدراج العناصر النقّالة(Amar and Hirochika, 2001; Hirochika, 2001) ومن أهمها تقنية التعددية الشكلية المضخمة بـين مواقـع إدخـال العناصـر النقّالـة-Inter Retrotransposon Amplfied Polymorphism (IRAP) و تقنية تضخيم قطـع الـدنا DNA المتوضعة بين موقع SSR وموقع إدخـال للعنصـر النقّـال -Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism (REMAP) واللتان تعتمدان على تفاعل البلمرة المتسلسل PCR(Waugh *et al.*,1997; Kalendar *et al.*,1999; Price *et al.*, 2003). وتعتمد تقنية REMAP على مكاثرة قطع الدنا بين موقع إدراج العناصـر النقّالـة retrotransposon وموقع لتتابع تكراري بسيط، في حين أن تقنية IRAP تعتمد على مكاثرة قطع الدنا DNA بين موقعي إدراج للعناصر النقّالـة retrotransposon. وتكشـف كـلا التقنيتين عن التباين الوراثي بالاعتماد على وجود أو عدم وجود نواتج التضخيم بتفاعل البلمرة

المتسلسل، حيث أن انعدام التضخيم يدل على غياب العناصر النقّالة في موقع معين على الجينوم.

تعد تقنية IRAP من تقنيات المعلّمات الجزيئية المعتمدة على تفاعل البلمرة المتسلسل، سريعة، سهلة وغير مكلفة نسبياً وتكشف عن مستويات عالية من التعددية الشكلية (Flavell *et al.*,1992)، كما أنها لاتحتاج إلى هضم الدنا أوتهجين المسبر لإظهار بيانات المعلّمات وهذا يزيد من سهولة وموثوقية التحليل وهي تقوم على مبدأ تضخيم منطقة من الدنا DNA تقع بين موقعي إدخال متجاورين للعناصر النقّالة وذلك باستخدام مرئستين تتعرفان على منطقة تعرف بالتكرار الطرفي الطويل long terminal repeat (LTR) المحددة لكل عنصر نقّال (Kalender *et al.*, 1999)، وبالتالي يتحدد التعدد الشكلي بوجود أو عدم وجود نواتج تضخيم (PCR Product) لهذه المناطق الواقعة بين عنصرين نقّالين (Inter-Retrotransposon) وفي حال عدم وجود أي تضخيم فهذا يعني عدم وجود العنصر النقّال Retrotransposon على الموقع المحدد وبالتالي فإنه يمكن الحصول على أفضل نتائج للتعدد الشكلي باستخدام تقنية IRAP عند استخدام مرئسات خاصة بمواقع العناصر النقّالة Retrotransposon والتي تمتلك عدد أكبرمن النسخ على الجينوم (Grzebelus., 2006).

وينتج التباين الوراثي في تقنية IRAP عن عملية حيوية فريدة للعناصر النقّالة retrotransposon إذ أن عملية إدراج العنصر النقال هي عملية لا عكوسة(irreversible event) ناتجة عن الإدراج في مواقع جديدة مع الاحتفاظ بالنسخ الأبوية في مكانها(Nakatsuka *et al.*, 2002). ينجم عن هذا الإدراج للعناصر النقّالة تعديل ضمن مجال بضع مئات إلى بضع آلاف من أزواج قواعد الدنا DNA مقارنة مع تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة المبنية على الاختلاف في واحد إلى بضع عشرات من أزواج القواعد (Price *et al.*, 2002).

طُبقت هذه التقنية بداية على الشعير من قبل Kalender ورفاقه عام1999 حيث تم تصميم مرئسات للتكرارات الطرفية الطويلةLTR الموافقة للعناصر النقّالة في الشعيرثم طبقت على عشرة أصناف من الشعير جمعت من عدة مجمعات وراثية حول العالم وناتجة عن برامج تربية مختلفة، وذلك بهدف إثبات قدرة هذه التقنية على التمييز والتوصيف الوراثي للأصناف المدروسة مقارنة بتقنيات أخرى وهي تقنية مابين تكراريات التسلسلات البسيطة ISSR (Inter-simple sequence repeats) و تقنية REMAP وأظهرت النتائج أن نسبة الحزم المتغايرة شكلياً(polymorphic bands) الناتجة عن تقنية IRAP بلغت 67 % مقارنة مع كل من ISSR(46.5%) و REMAP (62.3%) وتراوح حجم القطع المضخمة بين 2000-330 زوج قاعدي في تقنية IRAP و 300-2800 زوج قاعدي فيISSR و 250-2400

زوج قاعدي في تقنية REMAP. ولاختبار التكرارية تمت إعادة التجربة فأظهرت تقنيتي IRAP وREMAP تكرارية أعلى وبفرق معنوي مقارنة مع تقنية ISSR. كما أظهر مخطط التشابه الوراثي تجمع الأصناف المدروسة في مجموعات منفصلة تعكس الأصول الوراثية والجغرافية لهذه الأصناف وتتفق تماماً مع برامج التربية التي نتجت عنها هذه الأصناف.

استطاع Price ورفاقه عام 2002 تطبيق تقنية IRAP على النخيل الزيتي (Oil palm) حيث تمت قراءة اثنتين وعشرين حزمة وتم رسم ثماني عشرة منها في الخريطة الوراثية للنخيل الزيتي. أعطى زوجي المرنسات (LTR7R/LTR5R وLTR6F/LTR7R) حزماً متماثلة تقريباً في تتابع القواعد بنسبة 98-99% وبحجم 450 زوجاً قاعدياً، وهذا يدل على أن هذه الحزم هي تكرار طرفي طويل واحد أو أنها عدة تكرارات طرفية طويلة أدرجت في إحداها الأخرى. استطاعت هذه التقنية إظهار التعددية الشكلية من خلال تضخيم المنطقة بين موقعين من التكرارات الطرفية الطويلة LTR وفي كلا الاتجاهين وقد تم إثبات أن هذه التقنية لا تحتاج لهضم الدنا إلى قطع صغيرة باستخدام أنزيمات القطع أو إلى ربط المؤقلمات(Adapters). ويمكن استخدامها أيضاً في كشف التاريخ التطوري لإدراج العناصر النقّالة في جينوم النباتات.

استطاع Baumel ورفاقه عام 2002 اكتشاف تواجد العناصر النقّالة في الأنواع الأبوية للنوع *Spartina anglica* وهي*S. townsendii* و*S. alterniflora* وذلك باستخدام معلّمات IRAP وREMAP المتعددة المواقع. إذ أنه نتيجةً لفحص التغاير الشكلي في مجتمع *Spartina anglica* تم الكشف عن نمط وراثي واحد من العناصر النقالة وهومتعدد المواقع وهو مماثل لهجن الجيل الأول للأنواع الأبوية بالإضافة إلى وجود بعض المواقع الجديدة للعناصر النقالة في جينوم *Spartina anglica* مما يدل على أن جينوم هذا الأخير لم يطرأ عليه أية تغيرات شديدة منذ تشكله.

ثبت في السنوات الأخيرة والحالية أن لتطوير وتحديد البصمة الوراثية قيمة كبرى في مجالات التنوع الحيوي وأن توزع ووفرة العناصر النقّالة في جينوم النباتات يمنح أساساً متيناً لتطوير نظم معلّمات وراثية يعتمد عليها ووفقاً لذلك استطاع Varasano وآخرون في عام 2002 عن طريق فحص مكتبة الجينوم للكرز(Cherry) التعرف على تتابع مواقع التكرارات الطرفية الطويلة LTR ومن ثم تصميم المرنسات بناءاً على هذه التتابعات والتي استخدمت بدورها في تقنيتي IRAP و REMAP حيث تضخمت حزم قليلة بتقنية IRAP مما يدل على عدم تجمع العناصر النقّالة ضمن قطاعات عنقودية متقاربة ضمن الجينوم. أما في تقنية REMAP

فقد نتجت أنماط حزم معقدة تميّزت عن تقنية ISSR وبمعدل تعددية شكلية أعلـى ممـا دل على أن هذا النظام من أنظمة المعلّمات الوراثية هو الأكثر كفاءة في دراسات التنوع الوراثي.
تتميز منطقة التكرارات الطرفية الطويلة LTR بأنها مناطق محفوظة جداً في الجينوم أي قليلة التغيير وذلك لأنها تحتوي على تتابعات ضرورية للتعبير المورثي. تؤدي الإدراجات الجديدة للعناصر النقّالة إلى التباين في نمط إظهارتقنية IRAP لذلك قام Lightbourn ورفاقـه فـي عام 2002 باستخدام تقنيات AFLP وIRAP لتوصيف النباتات المتجددة والناتجة عن زراعة الأنسجة للهجن الجسمية من برنامج دمج البروتوبلاست لنوعين من البطاطا أحادية الصّـيغة الصّبغيّة (Haploid potato)، حيث تم تصميم مرئسات خاصة تتوافق مع التكرارالطرفـي الطويلLTR المميز للعناصر النقّالة (Tst1) والمعزول أصلاً من البطاطا وقـد نتجـت 78 حزمة عند تطبيق تقنية IRAP كانت منها حزمتان فريدتان مميّزتان للهجن الجسـمية عـن النباتات الناتجة عن التجديد والحاملة لصفات جسمية مغـايرة (somaclons) ناتجـة عـن الطفرات التي تعزى إلى الزراعة في أوساط مغذية اصطناعية. وقد كان عدد الحزم المضخمة أكثر ولكن مستوى التعدد الشكلي أقل بتقنية IRAP مقارنة بتقنية AFLP مما دل على عـدم نشاط الـعناصر النقّالة Tst1 أثناء تجدد البروتوبلاست إلى نبات كامل.
واجه العلماء صعوبات في دراسة التنوع الوراثي بين أصناف النوع *Citrus clementine* باستخدام المعلّمات الجزيئية وذلك لكون الأصناف الموجودة لم تنتج عن طريق التهجين بـل بواسطة انتخاب الطفرات التلقائية (spontaneous mutations) المؤثرة علـى الصـفات الزراعية المرغوبة وهذا ما يفسر بشكل جزئي التنوع الكبير للصـفات الزراعيـة مقارنـة بالتغيرات على المستوى الجزيئي وانطلاقاً من هذه الصعوبات قام `Breto ورفاقه في عـام 2002 باستخدام أشكال مختلفة من التقنيات التي تعتمد على التتابعات العشوائية، تكراريـات التسلسلات البسيطة وتتابعات العناصر النقّالة لكشف الطفرات والتهجين الجسـمي، ونشـاط العناصر النقّالة على التوالي حيث استخدمت هذه التقنيات لمقارنة التبـاين الـوراثي لأربعـة وعشرين صنفاً من Clementine. فأعطت تحاليل كـل مـن ISSR ، RAPD وAFLP حزمتين فقط متعددتين شكلياً (نسبة 2.4 %) وميّزت صنفين فقط ولم تكشف تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR عن أية تباينات. بينما باستخدام تقنية IRAP المعتمدة على تتابعين للعناصر النقّالة من شبيهات العناصر النقّالة Copia تم الحصول على تعددية شـكلية عاليـة (14.6 %) مقارنة بأنماط المعلّمات السابقة الذكر حيث انفصلت الأصناف المدروسـة إلـى مجموعتين متباعدتين جغرافياً الأولى من شمال إفريقيا والأخرى من اسبانيا.
وفي دراسة قام بها Yannic وزملاؤه في عام 2004 لدراسة التنوع الجزيئي بالاعتماد على المـادة الوراثيـة النوويـة (Nuclear genome) والمـادة الوراثيـة فـي حبيبـات

اليخضور(Chloroplast genome) لعشر مجتمعات نباتية للنوع *Spartina maritima* وذلك باستخدام عدة تقنيات وهي ISSR ،IRAP، RAPD و RFLP. أبدت النتائج مستوى منخفض جداً من التنوع الوراثي بين المجتمعات النباتية حيث أعطى معلماً واحداً فقط تعددية شكلية من أصل 98 معلم مبني على الجينوم، فسّر ذلك في ضوء التكاثر الخضري المحصور بين الأنواع الموجودة في منطقة الدراسة.

تمكن Pereira وآخرون في عام 2005 من عزل التتابع الكامل لأول عنصر نقّال Gret1 من النوع *Vitis vinifera* والمنتشر على طول الجينوم بمواقع متكررة والذي استخدم بدوره لتصميم المرئسات التي سمحت بتحليل جينوم أصناف من العنب وبتطبيق تقنيتي IRAP و REMAP ظهرت تعددية شكلية بين الأصناف مشيرة إلى الاختلافات في توزع العنصر Gret1 بين الأصناف ولكن ليس بين سلالات الصنف الواحد كما اقترحت نتائج الدراسات الخلوية و الجزيئية وجود دور للعنصر النقّال Gret1 في تنظيم المورثات(Gene regulation) وفي توضيح الاختلاف الكبير بالشكل الظاهري الموجود بين الأصناف.

استخدم Muhammad و Othman عام2005 تقنيتي RAPD و IRAP لتوصيف الصفات الجسمية المغايرة (somaclons) الناتجة عن الطفرات التي تعزى إلى الزراعة في أوساط مغذية اصطناعية وذلك لمجموعة من أصناف الموز المقاومة للفيوزاريوم، والناتجة عن طريق زراعة الأنسجة، ومجموعة أخرى من الأصناف غير المقاومة. فلوحظ لدى تطبيق تقنية RAPD أن خمس عشرة مرئسة من أصل ثماني وعشرين قد أعطت تعددية شكلية عالية و كانت نسبة التغاير المورثي 37.6% كما تراوح حجم القطع المضخمة بين 200-1500 زوج قاعدي. ووفقاً لمخطط التشابه الوراثي انفصلت الأصناف المقاومة عن غير المقاومة في مجموعتين متباعدتين بشكل واضح. ومع استخدام سبعة مرئسات وتطبيق تقنية IRAP أظهرت النتائج أنه عندما استخدمت المرئسات بشكل منفصل(نفس المرئسة باتجاهين) أعطت تغايراً وراثياً تراوح بين 8% و 50% كما تراوح عدد الحزم الناتجة بين خمس إلى ثلاث عشرة حزمة فكان إجمالي عدد الحزم 69 منها ثماني عشرة ذات تعددية شكلية (26%).أما في حالة استخدام المرئسات بشكل أزواج (Combination) نتجت85 حزمة كانت 12% منها متعددة شكلياً وبالمتوسط تراوحت نسبة التعددية الشكلية لكل مرئسة بين 11% و40%.وعند إعادة التجربة لاختبار التكرارية (Reproducibility) وبنفس الظروف السابقة لوحظ أن استخدام تقنية IRAP قد أدى إلى تكرارية عالية جداً 96% بينما لم تتجاوز التكرارية نسبة 75% في تقنية RAPD وبالتالي كانت تقنية IRAP أكثر كفاءة في توصيف و تمييز أصناف الموز المقاومة عن تلك غير المقاومة.

كذلك تم تصنيف وتوصيف أصناف الموز المزروعة في جنوب الهند باستخدام تقنية IRAP وطبقت على 36 صنف من أصناف الموز الناتجة من تهجين نوعين بريين هما (*Musa acuminate* Colla و *Musa balbisiana* Colla) والتي تعتبر مصدر الجينوم A و الجينوم B على الترتيب. حيث تم تصميم مرئسة تتعرف على التكرار الطرفي الطويل LTR المعرف للعنصر النقّال Ty3-gypsy ومن ثمّ تم تطبيقها على أصناف الموز موضوع الدراسة فأظهرت تعددية شكلية عالية ميّزت الأصناف عن بعضها البعض بشكل واضح. وتمكنوا من تحديد حزمة من الدنا DNA بوزن جزيئي 350 زوجاً قاعدياً ميّزت كل الأصناف التي تمتلك في مخزونها الوراثي على الجينوم B. وعند إعادة التجربة لاختبار التكرارية، كانت النتائج متطابقة. وبالتالي تم الحصول على معلّم جزيئي قادر على تمييز أصناف الموز التي تمتلك الجينوم B عن تلك التي لا تمتلكه الأمر الذي يسهل عمليات الانتخاب للأصناف ذات الأهمية في برامج التربية المستقبلية(Ashalatha *et al.*, 2005).

قام Guo ورفاقه عام 2005 بدراسة علاقات التشابه الوراثي بين طرز وراثية مختلفة من الكاكي (*Diospyros kaki* Thunb) باستخدام تقنيتي IRAP و REMAP حيث تمت دراسة اثني عشر طرازاً وراثياً بالإضافة إلى ستة أنواع تابعة للجنس *Diospyros sp.* حيث أظهرت كلتا التقنيتين تنوعاً شكلياً كبيراً بين مختلف الطرز الوراثية المدروسة وتمت مضاعفة 117 حزمة واضحة اعتمدت في تحليل النتائج تراوح حجمها بين 250 -2000 وكانت نسبة الحزم المتعددة شكلياً 86% مما سمح بتمييز كل من الطرز الوراثية المدروسة بعضها عن بعض بشكل واضح ومنفرد، وانفصلت بشكل واضح الطرز اليابانية والطرز الصينية والأنواع ذات الصلة وتراوحت قيمة معامل تشابه جاكارد (Jaccard Similarity coefficient) المحسوب من جمع بيانات التقنيتين بين 0.86 إلى 0.99 بالنسبة للطرز الوراثية اليابانية و بين 0.81 إلى 0.97 بالنسبة للطرز الوراثية الصينية.ولدى رسم شجرة التشابه الوراثي بالاعتماد على معامل التشابه انفصلت الطرز الوراثية المدروسة في أربع مجموعات وبحسب المواقع الجغرافية التي جمعت منها.

قام Teo ورفاقه عام 2005 باستخدام تقنية IRAP في توصيف ودراسة التركيب الوراثي لستة عشر صنفاً من أصناف الموز المختلفة وراثياً (ثنائية وثلاثية ورباعية الصّيغة الصّبغيّة) وباستخدام ستة عشر زوجاً من المرئسات نتجت 301 حزمة كانت 283 منها متنوعة بنسبة بلغت 94% وهي تعد نسبة عالية تعكس الاختلاف الكبير في التركيب الوراثي لأصناف الموز المدروسة كما أنه تم تحديد وتمييز حزم خاصة مميزة لكل من الجينوم A و الجينوم B وبالتالي تحديد التركيب الوراثي لكل هجين وراثي (AAB,ABB, AABB, AAAB). وقد أوضحت هذه النتائج آلية انتقال مواقع العناصر النقّالةretrotransposon عند تكوّن وإنشاء

الهجن، الأمر الذي يمكّن وبدرجة كبيرة من معرفة الأصول الوراثية لكل صـــنف أو هجـــين وراثي. وهذا ما أكّدته شجرة التشابه الوراثي بين الأصناف المدروسة والتي انفصـــلت فـــي مجموعات مستقلة ومتناسقة من حيث التشابه أو الأصول الوراثية سواء كانت ثنائية أو ثلاثية أو رباعية الصّيغة الصّبغيّة نقيّة التركيب الوراثي أو أنها هجن فيما بينها. وهذا ما لم تستطع تقنيات أخرى تمييزه في دراسات أخرى.

استطاع Antonius ورفاقه عام 2006 تحديد ثلاثة مـــن العناصـــر الوراثيـــة النقّالـــة ذات التكـــرارت الطرفيـــة القصـــيرة Terminal-repeat retrotransposon in miniature (TRIM) في جينوم التفاح *Malus domestica* و لوحظ حين استعمالها في تفاعل البلمـــرة المتسلسل ظهور الحزم المتعددة حتى باستخدام مرئسة واحدة فقط مما يدل على وجود عـــدد كبير من النسخ للعناصر النقّالة TRIM قد تكون متجمعة أو حتى متداخلة معاً ضمن منطقـــة من الجينوم وقد استخدمت هذه العناصر النقّالة كمعلّمات جزيئية باستخدام تقنيتـــي IRAP و REMAP لتوصيف تسعة عشر صنفاً من التفاح ودراسة العلاقات الوراثية بينها. إذ أعطت مرئسات TRIM التسعة أنماطاً متعددة من البصمة الوراثية للحمض النووي الريبي منقوص الأكسجين حتى حين استخدام مرئسة واحدة في تقنية IRAP حيث أعطت المرئسة الواحدة من ست إلى خمس عشرة حزمة فعالة. وكانت النتيجة أن كلاً من الأصناف المعيارية المدروســـة أعطت نمطاً منفرداً بينما أعطت الطفرات التابعة لنفس الصنف أنماطاً موحدة. ولقد تم العمل على هذه التجربة ضمن مخبرين متباعدين وتم الحصول على نتـــائج متطابقـــة مـــع بعـــض الاختلافات في قوة الحزم الناتجة. وبالتالي استطاعت كل من التقنيتـــين المطبقتـــين التمييـــز وبوضوح بين الأصناف المدروسة، ولكن ليس بين الأشكال الطفرية لها.

قام Tao ورفاقه عام2007 بدراسة التنوع الوراثي لـــ56 من الأجسام الثمرية لنـــوع الفطـــر المشروم *Tricholoma matsutake* ذي القيمة الغذائية العالية والذي ينمو طبيعياً في منطقة Yunnan الصينية، حيث تم جمع العينات من ثلاثة عشر موقعاً من تسعة منـــاطق مختلفـــة جغرافياً، وعند استخدام تقنية IRAP كان التنوع الـــوراثي بـــين المجموعـــات المدروســـة منخفضاً، بينما وجد معظم التغير ضمن المجتمعات وهذا ما أكده معامل التشابه 99%. ولدى رسم مخطط التشابه الوراثي، انفصلت الطرز في مجموعات تطابقت مع المواقع الجغرافيـــة التي جمعت منها.

وبهدف دراسة التشابه الوراثي بين 51 صنفاً من الأرز(.*Oryza sativa* L) قـــام Branco ورفاقه عام 2007 باستخدام تقنيتيIRAP و REMAP وباستخدام ستة أزواج من المرئسات المشتقة من العناصر النقّالة Tos17 وهي من مجموعة شبيهات العناصر النقّالة Copia حيث

٧٠٧٣٣٦

أنتجت أزواج المرشدات الستة المستخدمة في تقنية IRAP حزماً بمتوسط 9.16 حزمة و تعددية شكلية عالية(96%) إذ أعطى زوج المرشدات LTR2/LTR3 أعلى عدداً من الحزم(17) أما الزوج LTR4 فقد أعطى أقل عدد من الحزم(5). وبحساب معدل التشابه ومعامل الارتباط تم الاستنتاج أن الصنفين Yonoashi وMatsuyama هما أكثر الطرز الوراثية تشابهاً مما يفرض وجود علاقة قوية بين تحت مجموعة الأصناف اليابانية أما الصنفان K.sim وIAC5544 فقد كانا أكثر الأصناف تباعداً وبمخطط القطاعات تشكلت أربع مجموعات واضحة ومنفصلة حيث شملت تحت مجموعة من القطاع الرابع الأصناف البرازيلية المروية. كما تم الكشف عن وجود تشابه عالٍ بين الأصناف البرازيلية المروية والأصناف البرازيلية المزروعة في الأراضي المرتفعة مما تعارض مع النتائج السابقة لتقنية AFLP.

استطاع Häkkinen ورفاقه عام 2007 التمييز بين جينومي صنفين للموز *Musa beccarrii* var beccarrii و *Musa beccarrii* var hottana باستخدام تقنية IRAP حيث بينت التعددية الشكلية العالية الناتجة أن هذين الصنفين متباعدين وراثياً وهذا جاء مطابقاً للتوصيف الشكلي الذي تم مسبقاً لهذين الصنفين. إذ أعطت أزواج المرشدات الأربعة المستخدمة حزم متعددة بحجوم مختلفة. كما تمت ملاحظة وجود حزم نوعية محددة ميّزت بشكل واضح الصنفين beccarrii وhottana عن صنف آخر تابع للنوع *M. coccinea* كما ظهرت حزم إضافية مميزة مفردة خاصة بالصنف hottana ميّزته عن الصنف beccarrii مما دعى إلى الاقتراح أن الصنف beccarrii هو الأكثر قدماً في النشوء. كما تبين أن النسخ الجديدة من التكرارات الطرفية الطويلة LTR قد حافظت على مواقعها الأصلية ومع مرور الوقت أدى التراكم والتثبيت والاستئصال غير الكامل لمواقع الإدخال للعناصر النقّالة إلى توليد المزيد من حزم تقنية IRAP مما يدل على التنوع في الجينوم. كما فسر ظهور الحزم الخاصة في ضوء اندماج نسخ المواقع النقّالة بعد توزع جينوم الآباء كما أن الاختلاف في عدد الصبغيات بين *M.coccinea*(2n=20) و M. *beccarrii* var beccarrii (2n=18) يمكن أن يساهم في وجود أو غياب الحزم النوعية الخاصة بجنس الموز.

تمكن Alavi-kia ورفاقه عام 2008 وباستخدام تقنية IRAP من تحليل علاقات التنوع الوراثي والشكلي للأنماط الوراثية لجنس الزعفران *Crocus sp* المنتشرة في ايران اعتماداً على سبعة مرشدات للتكرارات الطرفية الطويلة(LTR) والمشتقة أساساً من الشعير حيث أعطى خمسة عشر زوجاً من المرشدات المستخدمة نتائج على جينوم الجنس *Crocus* بمعدل 65.9 ناتج تضخيم لكل عينة منفردة وهذا مما دل على وجود تشابه بين جينومي الشعير والزعفران في مناطق التكرارات الطرفية الطويلة LTR وكذلك قدرة معلّمات العناصر

النقّالة Retrotransposon على الانتقال بين الأجناس المختلفة. وقد بين تحليـــل الاخـــتلاف الجزيئي (Analysis of molecular variance, AMOVA) وجود تغاير وراثي معنـــوي بين المجتمعات (العشائر) 44.5% وبنسبة أعلى ضمن المجتمع الواحد (العشـــيرة)55.5% . كما أن تحليل التناسق (Principle Coordinate analysis) فصل المجتمعات المدروسة إلى مجموعات منفصلة، وذلك بالاعتماد على نمط العشيرة والأصل الجغرافي، كما أظهر التحليل تشابه كبيرة بين النوع المزروع *C. sativus* مع ثلاثة أنواع برية هي *C. almehensis* و *C. michelosnii* و *C. cancellatus*. بينما أظهر مخطط التشابه الوراثي اختلافـــاً عـــن النتائج السابقة بانفصال النوعين *C. gilanicus* و *C. caspius* في مجموعة منفردة. وعليه أظهرت هذه الدراسة أن الأنواع *C. almehensis* و *C. michelosnii* كانت الأقرب وراثياً للنوع المزروع *C. Sativus* وغالباً ما تعد هذه الأنواع هي الأسلاف البرية له.

الفصل الثاني

مواد و طرائق البحث

Materials and methods

مواد وطرائق البحث

Material and methods

تم إنجاز هذا البحث في قسم التقنيات الحيوية في الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية وفي قسم علوم البستنة في كلية الزراعة- جامعة دمشق، وذلك في عام 2008-2009 .

1- المادة النباتية plant material:

أجريت هذه الدراسة على ستة أصناف من المشمش ذات صفات شكلية وإنتاجية مميزة ومرغوبة (الملحق ،1) وتلعب دوراً هاماً في برامج تربية المشمش في سورية وهي: الشكربارا، التدمري، البلدي الماوردي، البلدي الحبي، الوزري، العجمي بالإضافة إلى خمسة طرز للأصل الكلابي للمشمش (K1,K2,K3,K4,K5).

تم جمع العينات النباتية من المجمع الوراثي التابع لإدارة البستنة في جوسية الخراب- الهيئة العامة للبحوث العلمية الزراعية في بداية شهر نيسان وأخذت النموات الورقية الحديثة من شجرة واحدة ممثلة لكل صنف وكذلك الحال بالنسبة لطرز المشمش الكلابي حيث مثلت كل شجرة طرازاً وراثياً مستقلاً، ثم تم غسل العينات وتنظيفها بالماء المقطر وتقطيعها إلى أجزاء صغيرة وتم وضعها في أنابيب Eppendorf معقمة سعة 2 مل ومن ثم تم تخزينها على درجة حرارة-80 م° لحين الاستخدام.

2 - استخلاص الدنا DNA extraction:

تم استخلاص الدنا(DNA) من العينات الورقية بطريقة CTAB كما هو مذكور عند Hormaza عام1998 مع تعديلات بسيطة و ذلك وفق الخطوات التالية:

أخذت العينات المحفوظة في المجمدة وأضيف لكل أنبوب Eppendorf كرية طحن ووضع الأنبوب في الآزوت السائل لتسهيل عملية طحن العينة بجهاز الطحن(Retsch 101 m) لمدة دقيقة واحدة وعلى سرعة 20 هرتز/دقيقة وتم الحصول على مسحوق ناعم من المادة النباتية. أخذت كمية 0.5 غرام من العينة المطحونة، ووضعت في أنابيب Eppendorf معقمة سعة 2مل وتم ترقيم الأنابيب حسب أرقام العينات النباتية، ثم أضيف لكل أنبوب 800 ميكروليتر من محلول الاستخلاص CTAB والمكون من:

100 mM Tris-HCl pH 8.0 , 1.4 M NaCl , 20 mM EDTA pH 8.0, 2% CTAB , 1% PVP, 0.2% β-mercaptoethanol.

تم تحضين العينات على درجة حرارة 65 م° لمدة نصف ساعة مع التحريك كل 10 دقائق، ومن ثم تمت إضافة حجم مماثل من كلوروفورم: أيزوأميل الكحول (24: 1) وذلك تحت المخلية ثم تم تحريك الأنابيب برفق مدة عشر دقائق.

وضعت الأنابيب في جهاز الطرد المركزي لمدة 15 دقيقة وبسرعة 6000 دورة / دقيقة على درجة حرارة الغرفة(15م°) حتى تشكل طوران علوي(upper aqueous phase) وكرية مترسبة، ثم نقل الطور العلوي المنفصل بحذر إلى أنابيب Eppendorf جديدة سعة 1.5 مل.

أعيدت خطوة الاستخلاص بالكلوروفوم:أيزوأميل الكحول من جديد ثم تمت إضافة 500 ميكروليتر من إيزوبروبانول البارد لترسيب DNA العينات مع التحريك بلطف وتحفظ على حرارة 26- م° مدة نصف ساعة.

تم تثفيل العينات في جهاز الطرد المركزي لمدة 5 دقائق وبسرعة 13000 دورة /دقيقة وبدرجة حرارة 4+ م° ثم تم التخلص من الرشاحة ، وغسلت الخثرة المترسبة في 500 ميكروليتر من محلول الغسيل المكون من الأمونيوم أسيتات 10مل مولار في 76% ايثانول لمدة 30 دقيقة.

تم تثفيل العينات لمدة 5 دقائق بسرعة 6000 دورة / دقيقة على درجة حرارة الغرفة وأزيلت الرشاحة بحذر وجففت كرية الدنا لمدة 45 دقيقة.

تم حل كرية الحمض النووي في 200 ميكروليتر من محلول (pH8.0) TE (10mM Tris-HCl,1mM EDTA) و تمت إضافة 2 ميكروليتر من محلول A الرناءيز بتركيز 10 ملغ/مل وحضنت العينات على درجة حرارة 37 م° لمدة 30 دقيقة وحفظت بدرجة حرارة +4م° لمدة 24 ساعة ومن ثم خزنت على درجة حرارة-20 م° لحين الاستخدام.

3- اختبار نوعية وتركيز الدنا :

Determination of DNA quality and concentration

تم قياس تركيز الدنا(DNA) بالاعتماد على طريقة الرحلان الكهربائي باستخدام هلامة أغاروز(agarose gel) تركيز1% مضافاً لها مادة Ethidium bromide، وبعد ذلك تم تحميل عينات الدنا على الهلامة مع معلّم قياسي (DNA Marker) معروف التركيز Precision (Molecular Mass Standard) من شركة BIO RAD وتم الرحلان على 90 فولت لمدة ساعة واستخدمت الأشعة فوق البنفسجية (UV) لتظهير حزم الدنا وتم تحديد تراكيز الحمض بمقارنة كثافة الحزم مع كثافة حزم المعلم مع تراكيز المعلم و قيس أيضاً تركيز ونقاوة الدنا في العينات باستخدام مقياس الطيف الضوئي (spectrophotometer) على طول موجة 260 و280 نانومتر.

ثم تم توحيد تركيز الدنا لكافة العينات(بمحلول TE) إلى50 نانوغرام بالميكروليتر وهو التركيز المطلوب في كلتا التقنيتين لتفاعل البلمرة المتسلسل (PCR).

4-تقنيـــــة تكراريـــــات التسلســـلات البســـيطة SSR :(Microsatellite, Simple Sequence Repeat)

4-1- تضاعف الدنا DNA Amplification:

تم استخدام 26 زوجاً من مرئسات تكراريات التسلسلات البســيطةSSR (primer-pairs) والمطورة من الدّراق(الجدول،1) بالاعتماد على قابلية انتقال معلّمـــات SSR بـــين الأنـــواع المرتبطة مع بعضها البعض(وفق التسلسل النيكلوتيدي الموصى به من قبل كل من Cipriani ورفاقه عام 1999 و Testolin ورفاقه عام 2000 وSosiniski ورفاقه عام2000 و Wang ورفاقه عام 2002) والمصنعة لدى شركة MWG GmbH، كما تم حساب درجات حـــرارة الالتحام المناسبة لكل زوج من المرئسات حيث اختلفت درجات الحرارة حسب عدد القواعـــد ونسبة GC حيث ترتفع بارتفاع هذه النسبة(الجدول،2)، ثم تم القيام بتفاعلات تضخيم الحمض النووي استناداً إلى طريقة Cipriani ورفاقه عام 1999مع بعض التعـــديلات . تـــم ضـــبط برنامج جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR طراز Mastercycler-Eppendorf و تحضير حجم تفاعل25 ميكرولتر(الجدول،3) وبعدد دورات بلغ 35 دورة، إذ تكونت كـــل دورة مـــن ثلاث مراحل تؤدي إلى توليد سلاسل جديدة من الدنا(DNA) (الجدول،4).

الجدول (1): التسلسل النكليوتيدي للمرنسات المستخدمة في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطة SSR والنسبة المئوية GC % وتكراريات التسلسلات البسيطة لكل مرنسة مع حجم الألليل المتوقع

الرقم	اسم المرنسة	التسلسل النيكلوتيدي	GC%	تكراريات التسلسلات البسيطة	حجم الألليل المتوقع
1	UDP96-001F	5' AGTTTGATTTTCTGATGCATCC 3'	36.4		
2	UDP96-001R	5' TGCCATAAGGACCGGTATGT 3'	50	(CA)17	111-150
3	UDP96-003F	5' TTGCTCAAAAGTGTCGTTGC 3'	45		
4	UDP96-003R	5' ACACGTAGTGCAACACTGGC 3'	55	(CT)11(CA)28	90-130
5	UDP96-005F	5' GTAACGCTCGCTACCACAAA 3'	50		
6	UDP96-005R	5' CCTGCATATCACCACCCAG 3'	57.9	(AC)16TG(CT)2CA(CT)11	80-260
7	UDP96-008F	5' TTGTACACACCCTCAGCCTG 3'	55		
8	UDP96-008R	5' TGCTGAGGTTCAGGTGAGTG 3'	55	(CA)23	110-140
9	UDP96-010F	5' CCCATGTGTGTCCACATCTC 3'	55		
10	UDP96-010R	5' TTGATGATTCCATGCGTCTC 3'	45	(GT)21(GAGT)4(GA)18	80-120
11	UDP96-018F	5' TTCTAATCTGGGCTATGGCG 3'	50		
12	UDP96-018R	5' GAAGTTCACATTTACGACAGGG 3'	45.5	(AC)21	210-260
13	UDP96-019F	5' TTGGTCATGAGCTAAGAAAACA 3'	36.4		
14	UDP96-019R	5' TAGTGGCACAGAGCAACACC 3'	55	(TG)18(AG)7	160-220
15	UDP97-402F	5' TCCCATAACCAAAAAAAACACC 3'	36.4		
16	UDP97-402R	5' TGGAGAAGGGTGGGTACTTG 3'	55	(AG)17	130-170
17	UDP98-405F	5' ACGTGATGAACTGACACCCA 3'	50		
18	UDP98-405R	5' GAGTCTTTGCTCTGCCATCC 3'	55	(AG)9	110-140
19	UDP98-406F	5' TCGGAAACTGGTAGTATGAACAGA 3'	41.7		
20	UDP98-406R	5' ATGGGTCGTATGCACAGTCA 3'	50	(AG)15	90-120
21	UDP98-409F	5' GCTGATGGGTTTTATGGTTTTC 3'	40.9		
22	UDP98-409R	5' CGGACTCTTATCCTCTATCAACA 3'	43.5	(AG)19	130-170
23	UDP98-021F	5' AAGCAGCAATTGGCAGAATC 3'	45		
24	UDP98-021R	5' GAATATGAGACGGTCCAGAAGC 3'	50	(GA)22(CA)11	110-140
25	UDP98-411F	5' AAGCCATCCACTCAGCACTC 3'	55		
26	UDP98-411R	5' CCAAAAACCAAAACCAAAGG 3'	40	(TC)16	160-190
27	UDP98-412F	5' AGGGAAAGTTTCTGCTGCAC 3'	50		
28	UDP98-412R	5' GCTGAAGACGACGATGATGA 3'	50	(AG)28	90-130
29	Pchgms2F	5' GTCAATGAGTTCAGTGTCTACACTC 3'	44		
30	Pchgms2R	5' AATCATAACATCATTCAGCCACTGC 3'	40	(CT)24	140-180
31	Pchgms4F	5' ATCTTCACAACCCTAATGTC 3'	40		
32	Pchgms4R	5' GTTGAGGCAAAAGACTTCAAT 3'	38.1	(CT)21	140-190
33	Pchcms5F	5' CGCCCATGACAAACTTA 3'	47.1		
34	Pchcms5R	5' GTCAAGAGGTACACCAG 3'	52.9	(CA)9(TA)8	240-300
35	pchgms11F1	5' AAGCAATAAAACCAGCAGCAA 3'	38.1		
36	pchgms11R1	5' TCAATCAATTGGCATGTTCG 3'	40	(TA)11	199-200
37	pchgms12F	5' CGACACTTAGCTAGAAGTTGCCTTA 3'	44		
38	pchgms12R	5' TCAAGCTCAAGGTACCAGCA 3'	50	(CT)9(TC)20(CA)9	442-490
39	pchgms14F	5' GCAAAGAGTACAACAATATCTACCG 3'	40		
40	pchgms14R	5' GGATGGTGAAGACGATGAGG 3'	55	(CT)11(CAA)11	500
41	pchgms17F	5' ATGCACTCAAGTGGCAAGC 3'	52.6		
42	pchgms17R	5' GGTTTTTGAGCAAAGATGCAC 3'	42.9	(AT)8	219
43	pchgms20F1	5' AATTGCATCACAGCAAGAGC 3'	45		
44	pchgms20R1	5' GGGGGTTTGGTTAAGATCG 3'	52.6		252
45	pchgms20F2	5' CCCTTACCCCCTTACCACTT 3'	55	(TA)15(TC)11	560
46	pchgms21F1	5' ACCACCATTTTGGCTCTCTG 3'	50		
47	pchgms21R1	5' ACCACCACAACCAAACCATT 3'	45		274
48	pchgms21R2	5' CATGCAACCCAAAACCATCT 3'	45	(TA)14	234
49	pchgms24F	5' CAACGAGCTCCCATGACTTT 3'	50		
50	pchgms24R	5' ACCACCACAACCAAACCATT 3'	45	(TA)12	509

الجدول(2): درجات حرارة الالتحام المناسبة لكل زوج من مرئسات تقنيةSSR

اسم زوج المرئسات	حـــــــرارة الالتحـــــــام(°م) Annealing temperature
UDP98-411F/R	
Pchgms4F/R	
Pchcms5F/R	50
R/UDP96-019F	
UDP97-402F / R	
pchgms11F1/R1	
pchgms17F/R	
pchgms20F1/R1	52
UDP96-001F/R	
pchgms21F1/R1	
pchgms21F1/R2	
pchgms24F/R	53
UDP96-003F/ R	
UDP96-005F/ R	
UDP96-010F/ R	
UDP98-405F/ R	
UDP98-406F/ R	
pchgms20R1/ F2	
pchgms14F/ R	
UDP98-021F/R	
UDP98-412F/R	54
pchgms12F/ R	
UDP96-018F/R	
UDP96-008F/ R	
UDP98-409F/ R	55
Pchgms2F/ R	57

الجدول (3): مكونات تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنيةSSR

المادة	التركيز النهائي
Taq buffer	1X
$MgCl_2$	2mM
dNTPs	0.32mM
primer F	4 p.m
primer R	4 p.m
Taq DNA polymerase	0.02 U
DNA	50 ng
H_2O	تكملة الحجم إلى 25 ميكروليتر

الجدول (4):برنامج عمل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR

عدد الدورات	الدورة	الزمن	الحرارة/ درجة مئوية
1	التمسخ (Denaturation)	5دقيقة	95
35	التمسخ(Denaturation)	1دقيقة	95
	الالتحام (Annealing)	1 دقيقة	حسب الحرارة المناسبة لكل زوج من المرئسات
	الاستطالة (Extension)	1دقيقة	72
1	الاستطالة(Extension)	10دقيقة	72
حفظ		لا نهاية	4

4-2-الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR Product electrophoresis:

تم فصل نواتج التفاعل بطريقتين مختلفتين:

4-2- 1- الرحلان على هلامة الميتافور آغاروز Metaphor agarose gel electrophoresis:

تم تحليل نواتج تفاعل البلمرة المتسلسل بتحميل 10 ميكروليتر من منتجات تفاعل البلمرة بعد صبغها بصبغة التحميل على هلامة الميتافور3% والتي تحتوي على الإيثيديوم برومايد، في جهاز الرحلان الكهربائي (BIORAD,USA) وبتطبيق جهد كهربائي مقداره 90 فولت لمدة ساعتين .

تم تظهير حزم الدنا (DNA) بتعريض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية وتم التصوير باستخدام جهاز توثيق الهلامة (Gel Decumentation) وقيس حجم الحزم الناتجة باستخدام معلّم DNA القياسي (100 زوج قاعدي) حيث أعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم0 (Romero *et al.*, 2003).

4-2-2- الرحلان على هلامة من البولي أكريلاميد Polyacrylamid gel electrophoresis:

تم الرحلان على هلامة الأكريلاميد (PAGE) والتي تتصف بالدقة العالية في فصل قطع الدنا المضخمة. وتشمل هذه الطريقة عدد من الخطوات وهي:

- تحضير محلول الأكريلاميد6% Preperation of 6% polyacrylamide (19:1) gels:

تــم حــل 6 غــرام أكريلاميــد(Acrylamide) +0.315 غــرام بــيس أكريلاميــد-Bis) Acrylamide) +42.2 غرام يوريا(Urea) في 10 مل من محلول 10X TBE و10 مــل من الماء المقطر وبعد ذلك أكمل الحجم إلى 100مل بالماء المقطر وذلك لتحضير 100مل من محلول الأكريلاميد وبعد تمام الذوبان تمت فلترة المحلول وحفظه في زجاجة عاتمة على +4 درجة مئوية.

* معاملة الألواح الزجاجية بمادة Repel-silane :

تم غسل الألواح الزجاجية بالماء المقطر بشكل جيد بعد ذلك نظف الوجه العلوي مــن اللــوح بالإيثانول 100% وذلك بمسح الألواح بالمناديل الورقية الناعمة بشكل دائري، ثم أضيف 300 ميكروليتر من مادة Repel-silane للوجه العلوي وتم المسح بالمناديل الورقية الناعمة بعــد ذلك مسح الوجه بالإيثانول 100% وترك ليجف، عند الانتهاء من تحضير اللوحين الزجاجيين والتأكد من تمام جفافهما وضعت الفواصل في مكانها المناسب ثم تــم جمــع كــلا اللــوحين بالمشابك المناسبة.

*صب هلامة الأكريلاميد Polyacrylamid gel pouring:

تمت عملية الصب بين الألواح ذات الأبعاد 16x16سم وذلك بعدما تم مــزج 20 مــل مــن محلول الأكريلاميد 6% مع 100 ميكروليتر من محلول Ammonium persulfate(25%) +20 ميكرو ليتر من مادة TEMED حيث مزجت جيداً وتم الصب بسرعة بــين اللــوحين الزجاجيين مع الحيلولة دون ظهور أي فقاعات والتخلص منها عند ظهورها، بعد ذلك وضع المشط وتركت الهلامة لمدة ساعتين حتى تجمد.

*-تحميل هلامة الأكريلاميد Polyacrylamid gel running:

أزيلت الفواصل والمشط من الهلامة ثم تم الغسيل بالماء المقطر من بقايا الأكريلاميد المتبلمر واليوريا ثم ركبت الألواح ضمن جهاز الرحلان الخاص وأضيف محلــول 1X TBE فــي الحوض العلوي والسفلي للجهاز وتمت عملية غسل الآبار باستخدام الإبرة ومحلــول TBE 1X.

تم تشغيل الجهاز مبدئياً لمدة 15 دقيقة تحت جهد كهربائي 200 فولت وذلك لتنظيف وتسخين الهلامة في هذه الأثناء تم فصل جديلتي منتجات تفاعل البلمرة المتسلسل لمدة 5 دقائق علــى درجة حرارة 95 مº في جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل وذلك بعدما تمــت إضــافة الصــبغة للعينات(5 ميكروليتر/25 ميكروليتر من نواتج التفاعل).

رفعت العينات من الجهاز مباشرة ووضعت في الثلج وتمت عملية غسيل الآبار للمرة الثانية، ثم تم تحميل6 ميكروليتر من منتجات تفاعل البلمرة المتسلسل(PCR) بالإضــافة لتحميــل3 ميكروليتر من المعلّم القياسي (100 زوج قاعدي) إلى جانبها وتمت عملية الــرحلان تحــت

200 فولت في البداية لمدة 10 دقائق ثم رفع الجهد الكهربائي إلى 400 فولت لمدة ساعة ونصف وذلك حتى اكتمال خروج الصبغة الزرقاء الداكنة(Bromophenol Blue) من الطرف السفلي للهلامة في حال كان حجم الحزم المتوقع صغيراً وحتى خروج الصبغة الزرقاء الفاتحة(Xylene cyanol) في حال كانت الحزم ذات حجم كبير (Ansorge, 1985).

*-تظهير الهلامة Gel visualisation :

تم تظهير الحزم باستخدام طريقة الصبغ بالفضة (silver staining) وفق الخطوات الموضحة في الجدول (5):

الجدول(5):خطوات طريقة الصبغ بالفضة

الخطوة/المعاملة	المادة المستخدمة	الحجم المطلوب	المدة الزمنية
1- التثبيت Fixation	100% إيثانول	20 مل	3 دقائق مع التحريك
	الماء المقطر	180 مل	
	حمض الخل	1 مل(يضاف قبل الاستخدام مباشرة)	
2- الصبغ staining	الماء المقطر	200مل	5 دقائق مع التحريك
	نترات الفضة	0.4 غرام	
3-4 الغسيل washing	الماء المقطر	200مل	ثوان قليلة
5- التظهير visualization	ماءات الصوديوم 1.5%	150مل	حتى بدء ظهور الحزم ووضوحها
	فورم ألدهيد	450 ميكرو ليتر	

وبعد ظهور الحزم بشكل واضح تم تصوير الهلامة وأعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم0 (Bsssam *et al.*, 1991).

5- تقنية التعددية الشكلية المضخمة بين مواقع إدخال العناصر النقالة IRAP :

5-1- تضاعف الدنا DNA Amplification:

استخدم جهاز تفاعل البلمرة المتسلسل PCR طراز Mastercycler-Eppendorf بحجم تفاعل 25 ميكرولتر وضحت مكوناته في الجدول (6) حيث أجري التفاعل ضمن ظروف التضخيم المحددة من قبل Branco ورفاقه عام 2007 مع بعض التعديلات البسيطة وبعدد من الدورات بلغ 35 دورة، حيث تكونت كل دورة من ثلاث مراحل أدت إلى توليد سلاسل جديدة من الدنا (DNA) كما هو مبين في الجدول (7). كما تم استخدام المرئسات الموصى بها من

قبل كل من Nakatsuka ورفاقه عام 2002 وKalendar ورفاقه عام1999 و المصنعة من قبل شركة MWG GmbH (الجدول،8). كما كانت درجات حرارة التحام جميع المرئسـات المسمّاة TDK هي 45.5 °م بينما أزواج المرئسات الأخرى فهي وفقاً للجدول(9).

الجدول (6):مكونات تفاعل البلمرة المتسلسلPCRلتقنيةIRAP

التركيز النهائي	المادة
1X	Taq buffer
3.5mM	$MgCl_2$
0.4mM	dNTPs
4 p.mol	primer F
4 p.mol	primer R
0.04	Taq DNA polymerase
50 ng	DNA
تكملة الحجم إلى 25ميكروليتر	H_2O

الجدول (7): برنامج عمل تفاعل البلمرة المتسلسل PCR لتقنية IRAP

الحرارة/ درجة مئوية	الزمن	الدورة	عدد الدورات
95	5 دقيقة	التمسخ (Denaturation)	1
95	1دقيقة	التمسخ(Denaturation)	35
حسب درجة الحرارة المناسبة لكل زوج من المرئسات	1.30 دقيقة	الالتحام (Annealing)	
72	2.30دقيقة	الاستطالة (Extension)	
72	10دقيقة	الاستطالة (Extension)	1
4	لا نهاية		حفظ

الجدول (8):التسلسل النكليوتيدي للمرئسات المستخدمة في تقنية IRAP

رقم المرئسة	اسم المرئسة	التسلسل النيكلوتيدي
51	TDK1 F	5' TCAATCGGACTTGTTCAAAACCCCA 3'
52	TDK1R	5' TACAGACCAAATGCTCACCATCACT 3'
53	TDK2F	5' GAAGTTAGTGGGAGCAAAAGATGT 3'
54	TDK2R	5' TACCAATGTCGGGAGGCTTGTGTCA 3'
55	TDK10F	5' CTTTGTGATAGAACTTGGGTTTGCT 3'
56	TDK10R	5' AGACTTGGTCCATCCTTCCTTTAGA 3'
57	TDK11F	5' AGGTATGGTTTCAAGATGATGGATG 3'
58	TDK11R	5' ACCCGCTGGTTGTGTCAGATAGATT 3'
59	TDK12F	5' ATACAACAGACTCAATGCCGACCCT 3'
60	TDK12R	5' ACCTGCCAACCAACTTCTTTTCCTC 3'
61	TDK13F	5' TCCTGATGGGAACTTCGTTGCTCGT 3'
62	TDK13R	5' CCTGACACCTCAAAACCTTCTGGCT 3'
63	LTR 6149F	5' CTCGCTCGCCCACTACATCAACCGCGTTTATT 3'
64	LTR 6150R	5′ CTGGTTCGGCCCATGTCTATGTATCCACACATGTA 3'
65	5-LTR1R	5′ TTGCCTCTAGGGCATATTTCCAACA 3′
66	5-LTR2R	5′ ATCATTCCCTCTAGGGCATAATTC 3′
67	3-LTR1F	'5′ TGTTTCCCATGCGACGTTCCCCAACA 3
68	Sakkula-F	5′ GATAGGGTCGCATCTTGGGCGTGAC 3′
69	Nikita-F	5′ CGCATTTGTTCAAGCCTAAACC 3′

الجدول(9) :درجات حرارة الالتحام المناسبة لعمل كل زوج من مرئسات تقنية IRAP

	LTR6149	LTR6150	5'LTR1	5'LTR2	3'LTR	Sukkula	Nikita
LTR6149	40.5	40.5	41.5	45.5	45.5	45.5	45.5
LTR6150		40.5	45.5	40.0	45.5	48.4	45.5
5'LTR1			41.5	43.2		43.2	40.5
5'LTR2				45.5	48.4	43.2	45.5
3'LTR					48.4	47.0	47.0
Sukkula						O	45.5
Nikita							48.4

O: أي لم يكن هناك اي تضخيم.

2-5- الرحلان الكهربائي لنواتج تفاعل البلمرة المتسلسل PCR products :electrophoresis

فصلت نواتج التفاعل بالرحلان الكهربائي بعدما تمت إضافة الصبغة (5 ميكروليتر/25 ميكروليتر من نواتج التفاعل) بتحميل 10 ميكروليتر من منتجات تفاعل البلمرة، على هلامة من الأغاروز (2.5%) احتوت على الإيثيديوم برومايد، بتطبيق جهد كهربائي90 فولت لمدة ثلاث ساعات ونصف. وقيس حجم الحزم الناتجة باستخدام معلّم VC DNA marker(vivantis).

تم تظهير حزم الدنا (DNA) بتعريض الهلامة للأشعة فوق البنفسجية و تم التصوير باستخدام جهاز توثيق الهلامة (Guo *et al.*, 2005).

6- التحليل الإحصائي staistical analyses:

تم إجراء التحليل الإحصائي لتحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف والسلالات المدروسة وتم تسجيل الحزم الناتجة عن كلتا التقنيتين (SSR, IRAP) على الشكل التالي:

أعطيت الحزمة الموجودة رقم 1 والحزمة الغائبة رقم0 . ثم استخدمت هذه البيانات الناتجة عن كل تقنية على حده لحساب درجة التشابه الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة وذلك بالاعتماد على معامل Jaccard (Jaccard, 1908) وفقاً للمعادلة التالية:

$$GS(ij)=a/(a+b+c)$$

GS: تمثل درجة التشابه الوراثية بين الطرازين الوراثيين i و j .

a : تمثل عدد الحزم المشتركة بين i وj.

b : تمثل عدد الحزم الموجودة في i، والغائبة في j.

c : تمثل عدد الحزم الغائبة في i ،والموجودة فيj .

فيما تم استخدام التحليل العنقودي الذي يعتمد على نسبة التشابه الوراثي، والتي تستخدم المتوسط الحسابي للمجموعة الزوجية غير المزانة UPGMA (Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages) وذلك للحصول على مخطط (dendrogram) لتقسيم الأصناف و الطرز المدروسة إلى مجموعات حسب درجة التشابه فيما بينها. كما تم حساب قيمBootstrap لتحديد موثوقية حدود مخطط التحليل العنقودي UPGMA برسم 1000 عينة عشوائية للقطع المتعددة شكلياً في كل من التقنيتين باستخدام البرنامج الإحصائي PAST (Hammer *et al.*, 2001).

تم حساب معدل التغاير المورثي المتوقع H_e (Expected heterozygosity) ونسبة التغاير المورثي الملحوظ H_o (Observed heterozygosity) في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطةSSR حيث تحسب قيمة معدل التغاير المورثي المتوقع من المعادلة:

$H_e = 1 - \sum P_i^2$ (Powell *et al.*, 1996)

حيث P_i: تكرارية الأليل في الموقع i.

أما نسبة التغاير الموروثي الملحوظ فهي نسبة الأفراد غير المتجانسة بين الأفـراد المدروسـة وذلك وفقاً لبرنامج Power marker version3.01 (Liu and Muse, 2005).

وتمت مقارنة كفاءة كلا التقنيتين في تقييم التنوع الوراثي بين جينوم أصناف وطرز المشمش المدروسة وكذلك معامل الارتباط(correlation coefficient) بين تقنيتي SSR وIRAP .

الفصل الثالث

النتائج والمناقشة

Results and discussion

النتائج والمناقشة

Results and Discussion

1-التعددية الشكلية (Polymorphism) بين الأصناف والطرز المدروسة:

ينتج التعدد الشكلي في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطةSSR عن الاختلاف في عدد الوحدات التكرارية في موقع التتابع التكراري البسيط عند استخدام أزواج المرئسات المصممة وفقاً للمنطقة المحيطة بالموقع وبالتالي يتحدد التعدد الشكلي باختلاف أطوال منتجات التضخيم لهذه المناطق باستعمال تقانة تفاعل البلمرة المتسلسل. بينما ينتج التعدد الشكلي في تقنية IRAP عند استخدام مرئسات خاصة بمواقع العناصر النقّالة تعمل على تضخيم منطقة من الدنا تقع بين موقعي إدخال متجاورين للعناصر النقّالة وذلك باستخدام مرئستين تتعرفان على منطقة التكرار الطرفي الطويل LTR المعرفة لكل عنصر نقال (Kalendar *et al.*, 1999). وبالتالي يتحدد التعدد الشكلي بوجود أو عدم وجود منتجات تضخيم (PCR Product) للمناطق الواقعة بين أي اثنين من العناصر النقّالة (Grzebelus, 2006).

1-1- التعددية الشكلية الناتجة عن تطبيق تقنية SSR:

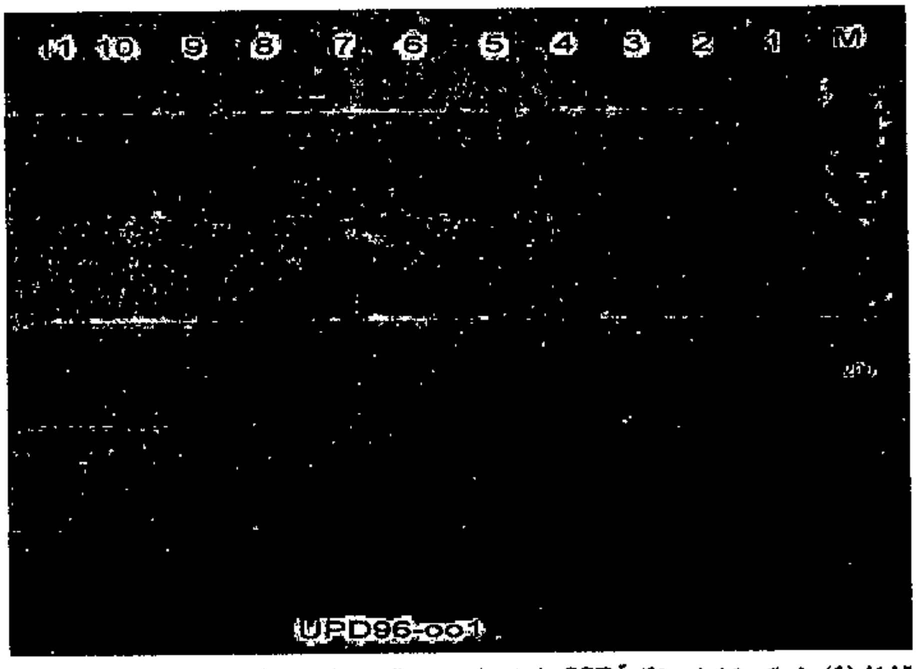
أعطت جميع أزواج المرئسات المستخدمة(26 زوج) منتجات تضخيم في تفاعل البلمرة المتسلسل وكان اثنان وعشرون زوج منها ذو فعالية كبيرة في كشف التعددية الشكلية بين الأصناف و الطرز المدروسة(84.6%) ،إذ أعطت الأزواج الست والعشرون من المرئسات ما مجموعه 78 أليل (قرين) منها 72 أليل متعدد شكلياً (92.3%) وبتعددية شكلية بلغت 92.3% إذ أعطت أزواج المرئسات (UDP98-405,pchgms4,pchgms12) تعدداً شكلياً متوسطاً(50.0, 66.6, 66.6على التوالي) بينما أعطت بقية أزواج المرئسات تعدداً شكلياً بنسبة 100 %، باستثناء ثلاثة أزواج من المرئسات المستخدمة لم تعط أية أليلات متعددة شكلياً وهي pchgms11, pchgms14, pchgms17.

وتراوح عدد الأليلات في المواقع المختلفة بين 1-6 أليل بمعدل 2.8 أليل متعدد في كل موقع حيث أعطى زوج المرئسة UDP96-008 أعلى عدد من الأليلات (6 أليل) بينما أعطت أزواج المرئساتpchgms14,pchgms11,pchgms17 أقل عدد من الأليلات(1 أليل) (الجدول،10 والأشكال1,2,3,4,5)، ويختلف عدد الأليلات في كل موقع حسب خاصية

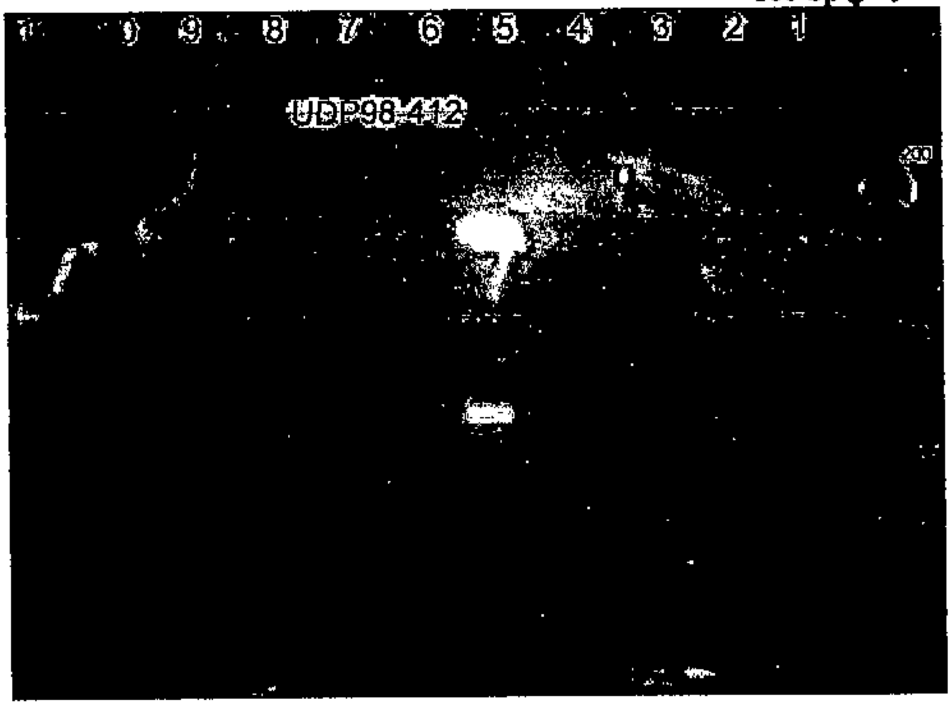
الوحدات التكرارية لمواقع التتابعات فيكون منخفضاً عندما تكون الوحدات التكرارية في الموقع بسيطة وغالباً قصيرة ويزداد عدد الأُلليلات بزيادة طول التكرار أو زيادة تعقيده.

الجدول(10): عدد الأُلليلات الناتجة عن ازواج المرنسات المستخدمة في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطةSSR وعدد الأُلليلات المتعددة شكلياً Polymorphic alleles وعدد الأُلليلات غير المتعـددة شـكلياًnon polymorphic allels و النسـبة المئوية للتعددية الشكلية Polymorphism% وحجم الأُلليلات الناتجة.

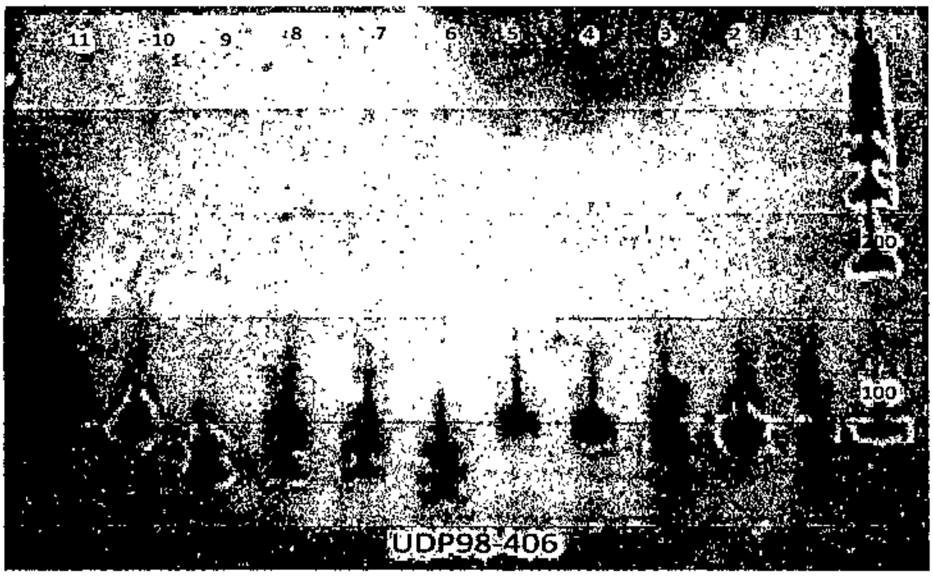
المرنسة	عدد الأُلليلات الناتجة	عدد الأُلليلات المتعددة شكلياً	عدد الأُلليلات غير المتعددة شكليا	النسبةالمئوية للتعدديةالشكلية	حجم الأُلليلات الناتجة
UDP96-001	2	2	0	100	110-113
UDP96-003	4	4	0	100	90-130
UDP96-005	4	4	0	100	80-140
UDP96-008	6	6	0	100	110-140
UDP96-010	3	3	0	100	80-120
UDP96-018	2	2	0	100	210-260
UDP96-019	5	5	0	100	160-220
UDP97-402	4	4	0	100	130-170
UDP98-405	3	2	1	66.6	110-140
UDP98-406	3	3	0	100	90-120
UDP98-409	5	5	0	100	150-170
UDP98-021	4	4	0	100	110-140
UDP98-411	3	3	0	100	160-190
UDP98-412	4	4	0	100	90-120
Pchgms2	4	4	0	100	140-180
Pchgms4	3	2	1	66.6	150-190
Pchgms5	4	4	0	100	300
Pchgms11	1	0	1	0	200
Pchgms12	2	1	1	50	500
Pchgms14	1	0	1	0	500
Pchgms17	1	0	1	0	219
pchgms20F1/R1	2	2	0	100	250-255
pchgms20R1/pchgms20F2	2	2	0	100	560
pchgms21F1/pchgms21R1	2	2	0	100	288
pchgms21F1/pchgms21R2	2	2	0	100	250
Pchgms24	2	2	0	100	500
المجموع	78	72	6		
المتوسط	3	2.8	0.23	92.3	



الشكل(1): نواتج تضخيم تقنيةSSR باستخدام زوج المرنسات DP96-001 والرحلان على هلامة الأكريلاميد حيث:(1)شكربارا،(2)تــدمري،(3)بلـــدي مــاوردي، (4) بلـــدي حبـــي،(5)وزري(6) عجمـــي،(7)K1، (8)K2، (9)K3، (10)K4، (11)K5، (M) المعلم القياسي 100 bp



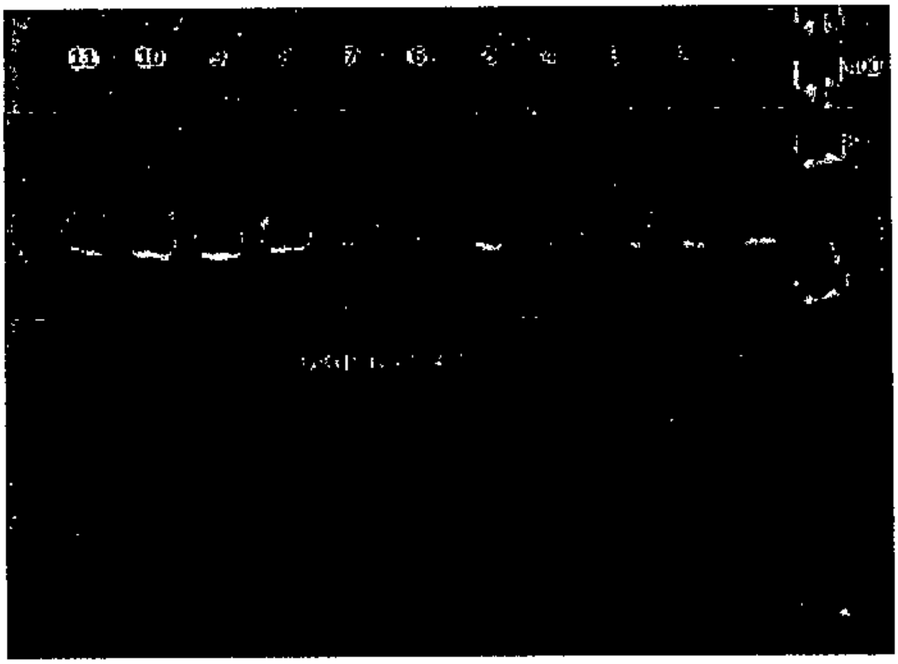
الشكل(2):نواتج تضخيم تقنيةSSR باستخدام زوج المرنسات UDP98-412 والــرحلان علـــى هلامة الأكريلاميد حيث:(1)شكربارا،(2)تدمري،(3)بلدي ماوردي، (4) بلـــدي حبـــي،(5) وزري،(6)عجمـــــــــــي،(7)K1، (8)K2، (9)K3، K4(10)، K5 (11)،(M) المعلـــم القياسي100 bp.



الشكل(3): نواتج تضخيم تقنيةSSR باستخدام زوج المرئسات UDP98-406 والـــرحلان على هلامة الأكريلاميد حيث:(1)شكربارا،(2)تدمري،(3)بلدي ماوردي، (4) بلدي حبـــي،(5) وزري،(6)عجمـــي،K1(7)، K2(8)، K3(9)، K4(10)، K5(11)، (M) المعلم القياسي.100 bp



الشكل(4): نواتج تضخيم تقنيـــةSSR باســـتخدام زوج المرئســـات Pchgms 20F1-R1 والرحلان على هلامة الأكريلاميد حيث:(1)شكربارا،(2)تدمري،(3)بلدي مـــاوردي، (4) بلـــدي حبـــي،(5) وزري،(6)عجمـــي،K1(7)، K2(8)، K3(9)، K4(10)، K5(11)، (M) المعلم القياسيbp 100.



الشكل(5): نواتج تضخيم تقنيةSSR باستخدام زوج المرئسات Pchgms 21F1-R1 والرحلان على هلامة الأكريلاميد حيث حيث:(1)شكربارا،(2)تدمري،(3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي،(5) وزري،(6)عجمي،(7)K1، (8)K2، (9)K3، (10)K4، (11)K5، (M) المعلم القياسي100 bp.

كما اختلف عدد الألليلات في أصناف و طرز المشمش المدروسة وذلك باستخدام أزواج المرئسات الست والعشرين المستخدمة، حيث تراوح عددها بين 32 و 38 ألليل أقلها في الطراز K1 وأعلاها في الصنفين شكربارا والبلدي الماوردي وفي الطراز K4 بينما تساوت أعداد الألليلات في الصنف العجمي و الطراز K2 (36 ألليل) وفي الصنفين البلدي الحبي و الوزري و الطراز K3 (34 ألليل)(الجدول،11).

الجدول (11): عدد الأليلات الناتجة عن أزواج المرئسات المستخدمة في تقنية تكراريات التسلسلات البسيطةSSR في الأصناف و الطرزالمدروسة

الصنف/الطراز / المرئسة	الشكربارا	التدمري	البلدي الماوردي	البلدي الحبي	الوزري	العجمي	K1	K2	K3	K4	K5
UDP96-001	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1
UDP96-003	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2
UDP96-005	2	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2
UDP96-008	1	1	1	1	1	2	2	2	1	2	2
UDP96-010	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	1
UDP96-018	1	2	1	1	1	1	1	2	1	1	1
UDP96-019	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
UDP97-402	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
UDP98-405	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
UDP98-406	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	2
UDP98-409	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
UDP98-021	1	1	2	1	1	2	1	1	2	2	1
UDP98-411	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2
UDP98-412	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Pchgms2	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	2
Pchgms4	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
Pchcms5	2	1	2	1	1	2	1	1	1	1	1
pchgms11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms12	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms20F1/R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms20R1/pchgms20F2	2	2	2	2	2	0	2	2	2	2	2
pchgms21F1/pchgms21R1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms21F1/pchgms21R2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
pchgms24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
المجموع	**38**	**35**	**38**	**34**	**34**	**36**	**32**	**36**	**34**	**38**	**37**

أعطت جميع المرئسات المستخدمة في هذه الدراسة نواتج تضخيم واضحة و لقد كانت هـذه النسبة (100 %) أعلى من النسبة (90 %) التي حصل عليها Ruthner ورفاقه عام 2006 ومن النسبة60 % عند Zhebentyayeva ورفاقه عام2003 وكذلك من النسـبة 68.75 % عند Romero ورفاقه عام 2003 ويعزى السبب في ارتفاع هذه النسبة في هذا البحث هـو استخدام مرئسات منتقاة أعطت تضخيماً واضحاً في المشمش في دراسات سابقة.

كما بلغت نسبة المرئسات التي أعطت تعددية شكلية في هذه الدراسة 84.6% وهـي كانـت أعلى من النسبة عند Zhebentyayeva ورفاقه عام 2003(66.6%) ومقاربة للنسبة85.5% عند Ruthner ورفاقه عام 2006.

تطابقت نتيجة التعددية الشكلية في هذا البحث(92.3%) مع نتيجة التعددية الشكلية عند Tian-Ming ورفاقه عام2007 والتي تراوحت ما بين 80.54 إلى 85.41 % في المجتمعات البرية الثلاث للمشمش التي تمت دراستها.

أما بالنسبة للتعددية الشكلية للمرئسات فلقد تطابقت نسبة التعددية الشكلية لزوج المرئسة Pchgms4 في هذه الدراسة مع ماوجده Tian-Ming ورفاقه عام2007 حيث بلغت 66.6% بينما كانت نسبة التعددية الشكلية(100%) لزوجي المرئستين Pchgms2 و Pchgms5 أعلى مما قد تم الحصول عليه لديهم حيث بلغت 88.89% و77.31% لكل منهما على التوالي .

بلغ متوسط عدد الأليلات المتعددة شكلياً في الموقع 2.8 أليل /موقع حيث تراوح عددها بين1 و6 أليل متعدد في الموقع وقد كانت النتيجة مطابقة لدراساتDirlewanger ورفاقه عام2002 على الكرز(2.8 أليل/موقع) ومقاربة لما وجده Aranzana ورفاقه عام2002 في الدراق (3.2 أليل /موقع) ومع Romero ورفاقه عام 2003 في المشمش(3.10) ومع Ruthner ورفاقه عام2006 (3.5) ولكن أقل مما لاحظه Hormaza 2002 في المشمش(4.1) و Testolin ورفاقه عام2000 (4.2) و Dirlewanger ورفاقه عام 2002 في الدراق (4.5) بعدد أليلات تراوح بين1 إلى 9 أليل متعدد/موقع.

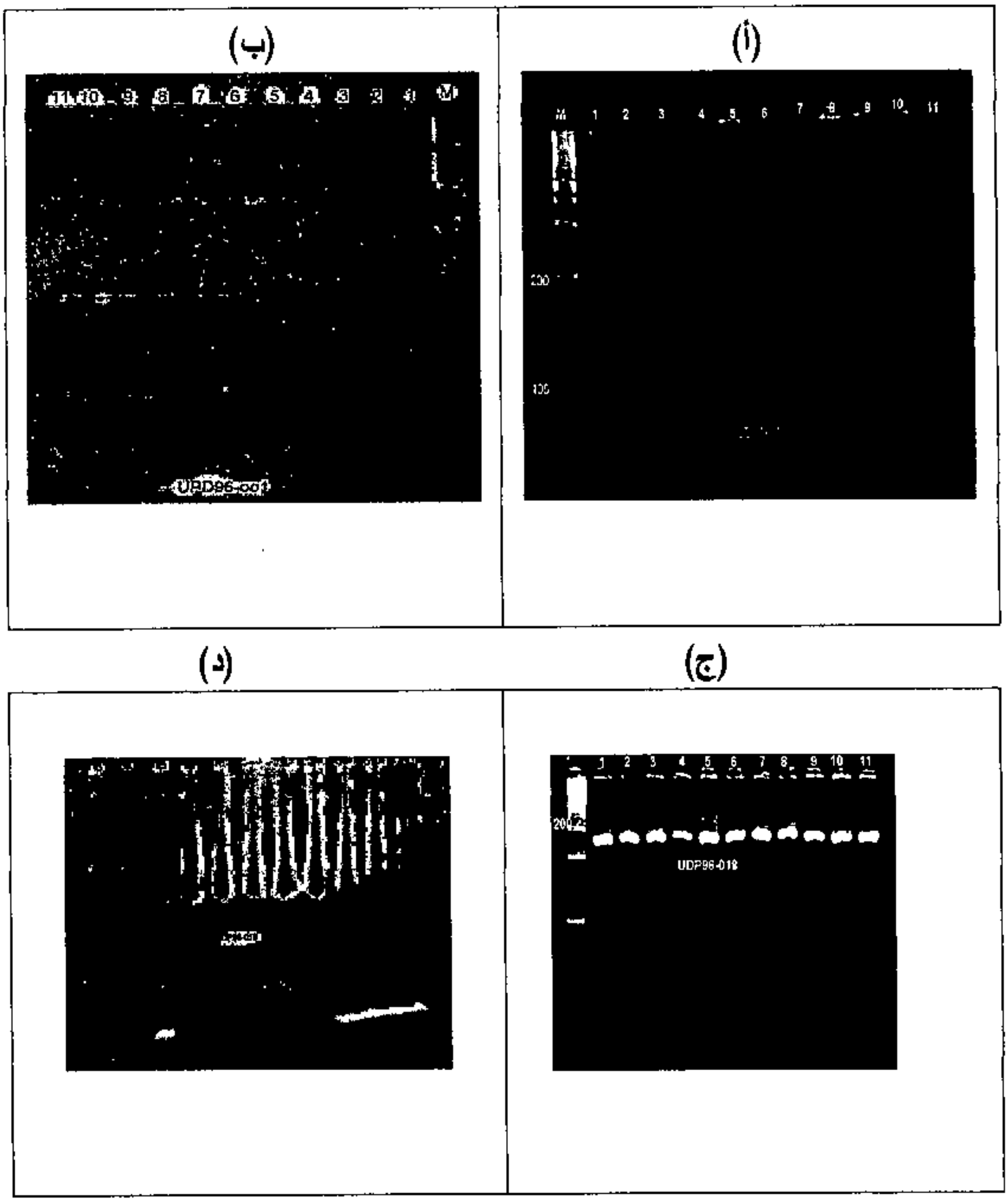
كما أن حجوم جميع الأليلات الناتجة كانت مشابهة لتلك المسجلة من قبل Cipriani ورفاقه عام 1999 و Testolin ورفاقه عام 2000 في المشمش وكذلك Hormaza و Aranzana ورفاقه عام2002 في المشمش والدراق على التوالي وهذا مما يدل على أن مواقع تكرارات التسلسلات البسيطة في الدراق هي ذاتها في المشمش.

لقد اتفقت نتائج هذه الدراسة مع Ruthner ورفاقه عام2006 في أن زوج المرئسة pchgms14 لم يعط أية حزم متعددة شكلياً وخالفت Cipriani ورفاقه. عام1999 عندما تمت دراسة قابلية انتقال معلّمات تكرارات التسلسلات البسيطة SSR في أنواع الجنس *Prunus* وهي (الخوخ الأوروبي، الخوخ الياباني، المشمش ، اللوز، الدراق، النكتارين، الكرز الحلو والكرز الحامض فأعطى زوج المرئسة UDP96-010 تضخيماً فقط في أصناف الدراق الحقيقي بينما في هذه الدراسة أعطى تضخيم واضح في أصناف وطرز المشمش المدروسة. كما ان زوج المرئسة UDP98-411 الذي تم حذفه من بيانات Romero ورفاقه(2003) السابقة لعدم تمكنه من الكشف عن فروق أليلية (null allele) في 11 صنف من المشمش قد أعطى أليلات في كل الأصناف في الدراسة الحالية كما أنه في الدراسة السابقة لـ Romero ورفاقه غاب الأليل في احد الأصناف المدروسة عند استخدام زوج المرئسة UDP96-018 بينما غاب الأليل في هذه الدراسة من الصنف العجمي باستخدام زوج

المرئساتpchgms20R1/pchgms20F2 وهذا قد يدل على حدوث طفرة في مكان ارتباط المرئسة بالمنطقة المحيطة بموقع تكراريات التسلسلات البسيطة.

أما بالنسبة لقابلية انتقال معلّمات تكراريات التسلسلات البسيطة (SSR) في أنــواع الجــنس *Prunus* والتي يقصد بها إمكانية استخدام مرئسات تكراريات التسلسلات البسيطة المطــورة بناءاً على تتابع القواعد في الدنا في أحد الأنواع التابعة لجنس معين مع أنواع أخــرى تتبــع لنفس الجنس فلقد لوحظت إمكانية الانتقال العالية لمعلّماتSSR بين انواع الجــنس *Prunus* وذلك عندما تم استخدام مرئسات جميعها مطورة من الدراق في دراسة التنوع الــوراثي فــي المشمش إذ أن جميع أزواج المرئسات المستخدمة كانت قادرة على تضخيم مواقع لتكراريات التسلسلات البسيطة SSR في المشمش ولقد كانت84.6% منها متعددة شكلياً وهذا توافق مع Ruthner عام 2006 حيث أعطت 90 % من أزواج المرئسات التي تم اســتخدامها فــي دراسته السابقة تضخيماً في المشمش وأكثر من نصف أزواج المرئسات أعطت تعددية شكلية. ولاختبار التكرارية تمت إعادة التجربة فأظهرت هذه التقنية تكرارية عاليــة وبنســبة 100% ولعدة مرات مما يزيد من موثوقية ومصداقية هذه التقنية .

وبالمقارنة بين طريقتي التظهيرلنتائج تقنيــة SSR بــالرحلان الكهربــائي علــى هلامــة الأكريلاميد والصبغ بنترات الفضة والرحلان الكهربائي على هلامـــة الميتــافور أغــاروز والصبغ بالإيثيديوم برومايد، اللتين تم استخدامهما نجد أن التظهير باستخدام الميتافور آغاروز كانت الطريقة الأسهل والأسرع حيث أن ظهور الحزم المقطعة جعل من الصعب تحديد عدد الأليلات بطريقة الأكريلاميد مقارنة بالميتافور آغاروزحيث كانت أفضل النتائج عند حجــوم أليلات تراوحت بين 100-200 زوج قاعدي على الرغم مــن أن التظهيــر علــى هلامــة الأكريلاميد يعد أكثر دقة في الكشف عن التباينات بين الأليلات بفروق 2 زوج قاعدي إذ أن بعض الأليلات التي تعد متماثلة شكلياً على هلامة الآغاروز تظهر متعددة شكلياً على هلامة الأكريلاميد(الشكل،6) وهذا توافق مع ما تمت ملاحظته في دراسة Ruthner ورفاقــه عــام 2006.



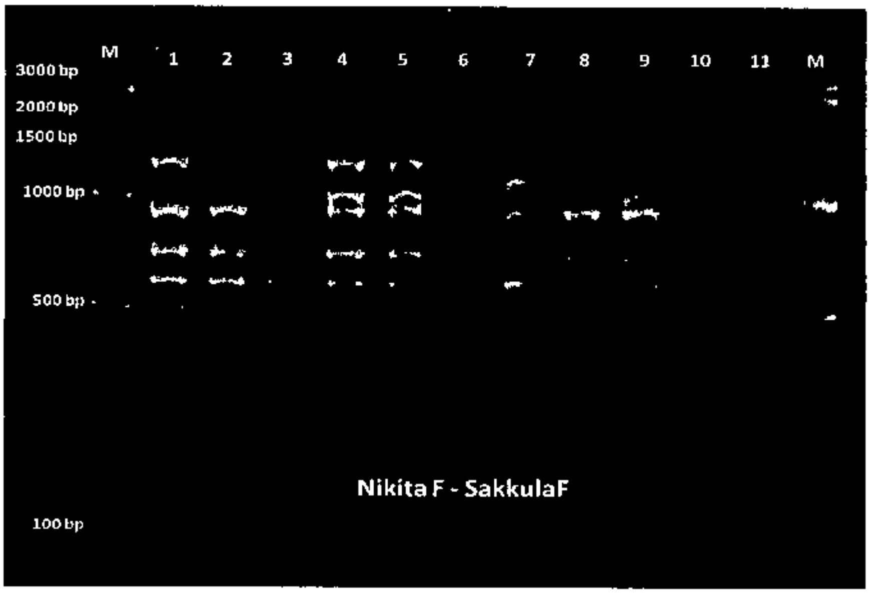
الشكل(6):الفرق بين نماذج الحزم الناتجة من تقنية SSR بطريقتي التظهير المختلفتين:حيث (أ):نواتج تفاعل المرنسة UDP96-001 على هلامة الميتافور،(ب):نواتج تفاعل المرنسة UDP96-001 على هلامة الأكريلاميد،(ج): نواتج تفاعل المرنسة UDP96-018 على هلامة ميتافور(د) : نواتج تفاعل المرنسة UDP96-018 على هلامة الأكريلاميد حيث:(1)شكربارا،(2)تدمري،(3)بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي،(5) وزري،(6)عجمي،(7)K1، K2(8)، K3(9)، K4(10)، K5(11)، (M)، المعلم القياسي100 bp.

1-2-التعددية الشكلية (polymorphism) الناتجة عن استخدام تقنية IRAP:

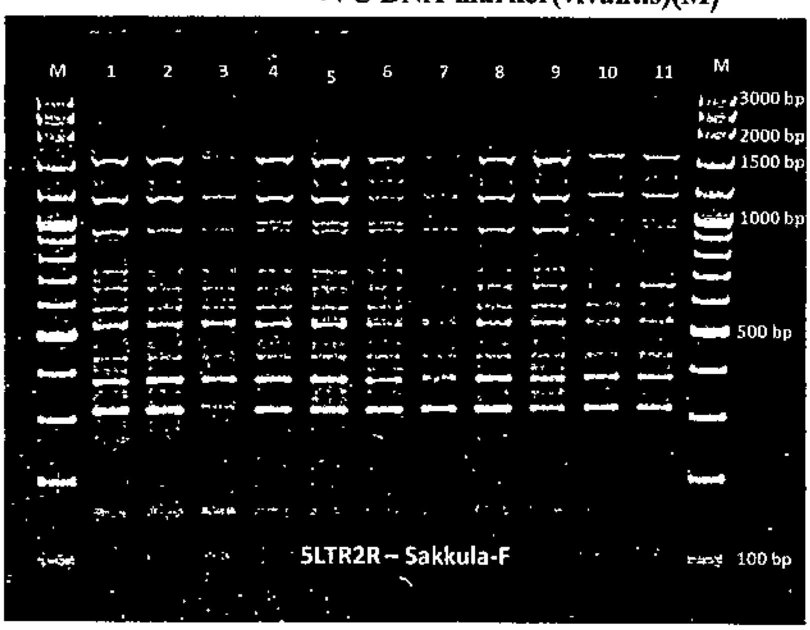
أعطت كافة أزواج المرئسات(33 زوج) تضخيماً واضحاً باستثناء المرئسة Sakkula وأثبتت 32 منها فعالية في كشف التباينات الوراثية بين الطرز والأصناف المدروسة فقد أعطت أزواج المرئسات المستخدمة ما مجموعه 344 حزمة في مجموع الأصناف والطرز المدروسة كافة حيث بلغت بالمتوسط10.75 حزمة لزوج المرئسة الواحد و كان من بينها 88 حزمة متشابهة (monomorphic) و256 حزمة متعددة شكلياً(polymorphic) حيث بلغت النسبة المئوية للتعددية الشكلية 74.4 % وهذا مما يدل على الانتشار الواسع للعناصر النقّالة في جينوم أصناف وطرز المشمش المدروسة (الجدول،12 والأشكال 7,8,9,10)، حيث أعطى زوج المرئسات LTR6149F/NikitaF أعلى عدد من الحزم (24 حزمة) في حين أعطت ستة أزواج من المرئسات LTR 6149F/3-LTR1F ، 5-LTR1R/5-LTR2R ، 5-LTR1R/ Nikita-F، 5-LTR2R/3-LTR1F و3-LTR1F/ Sakkula-F أقل عدد من الحزم (5 حزم) وربما يعزى ذلك للانتشار المحدود للعناصر النقّالة التي استخدمت لتصميم أزواج المرئسات الستة السابقة.

الجدول(12) : عدد الحزم الكلي، وعدد الحزم المتعددة شكليا، وغير المتعددة شكلياً و النسبة المئوية للتعددية الشكلية الناتجة عن المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP في الأصناف و الطرز المدروسة :

المرئسة	عددالحزم الناتجة	عدد الحزم المتعددة شكلياً	عدد الحزم غير المتعددة شكليا	النسبة المئوية للتعددية الشكلية
TDK1	8	5	3	62.5
TDK2	10	6	4	60
TDK10	11	9	2	81.8
TDK11	10	8	2	80
TDK12	14	13	1	92.8
TDK13	10	7	3	70
LTR 6149F	11	8	3	72.7
LTR 6149F/ LTR 6150R	7	4	3	57.1
LTR 6149F/5-LTR1R	9	6	3	66.7
LTR 6149F/5-LTR2R	14	11	3	78.6
LTR 6149F/3-LTR1F	5	2	3	40
LTR 6149F/ Sakkula-F	14	14	0	100
LTR 6149F/ Nikita-F	24	16	8	66.7
LTR 6150R	15	13	2	86.7
LTR 6150R/5-LTR1R	15	10	5	66.7
LTR 6150R/5-LTR2R	12	11	1	91.7
LTR 6150R/3-LTR1F	10	7	3	70
LTR 6150R/ Sakkula-F	12	7	5	58.3
LTR 6150R/ Nikita-F	11	9	2	81.8
5-LTR1R	9	6	3	66.7
5-LTR1R/5-LTR2R	5	2	3	40
5-LTR1R/ Sakkula-F	9	6	3	66.7
5-LTR1R/ Nikita-F	5	3	2	60
5-LTR2R	11	9	2	81.8
5-LTR2R/3-LTR1F	5	5	0	100
5-LTR2R/ Sakkula-F	14	12	2	85.7
5-LTR2R/ Nikita-F	13	11	2	84.6
3-LTR1F	6	5	1	83.3
3-LTR1F/ Sakkula-F	5	3	2	60
3-LTR1F/ Nikita-F	8	4	4	50
Sakkula-F/ Nikita-F	16	13	3	81.3
Nikita-F	16	11	5	68.8
المجموع	344	256	88	
المتوسط	10.75	8	2.75	74.4



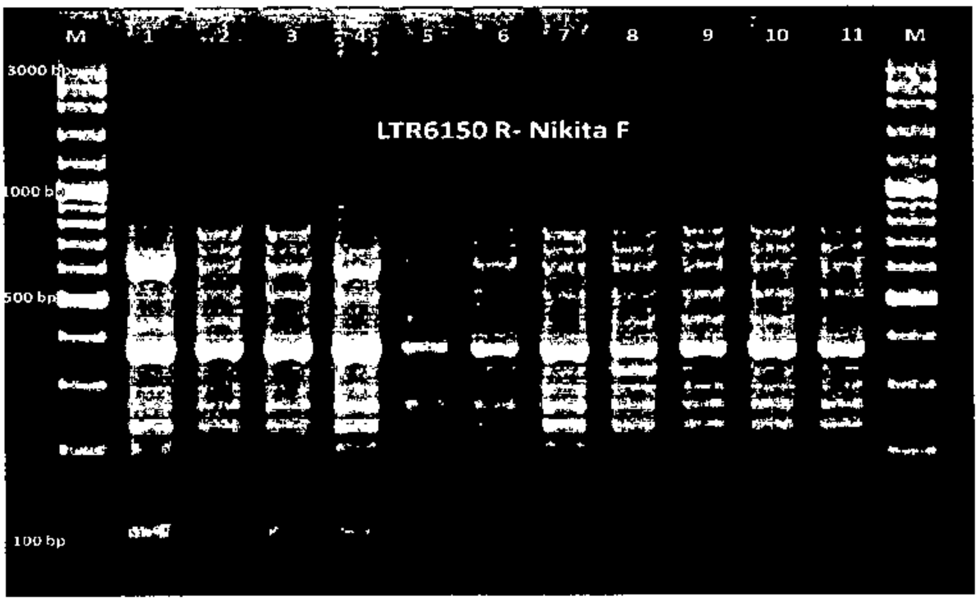
الشكل(7): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرنسات NikitaF- وSakkulaF الرحلان على هلامة الأغاروز حيث:(1) شكربارا،(2)تدمري،(3)بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي،(5) وزري،(6)عجمي،(7)K1، K2(8)، K3(9)، K4(10)، K5(11)، VC DNA marker(vivantis)(M).



الشكل(8): نواتج تضخيم تقنية IRAP باستخدام زوج المرنسات 5LTR2R- وSakkulaF الرحلان على هلامة الأغاروز حيث:(1) شكربارا،(2)تدمري،(3)بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي،(5) وزري،(6)عجمي،(7)K1، K2(8)، K3(9)، K4(10)، K5(11)، VC DNA marker(vivantis)(M)



الشكل(9): نواتج تضخيم تقنيةIRAP باستخدام زوج المرئسات -LTR6149F 3LTR2Rوالرحلان على هلامة الأغاروز حيث:(1) شكربارا،(2) تدمري،(3) بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي،(5) وزري،(6)عجمي،(7)K1، (8)K2، (9)K3، K4(10)، K5(11)، VC DNA marker(vivantis)(M)



الشكل(10):نواتج تضخيم تقنيةIRAP باستخدام زوج المرئسات -LTR6150R NikitaFوالرحلان على هلامة الأغاروز حيث:(1) شكربارا،(2)تدمري،(3)بلدي ماوردي، (4) بلدي حبي،(5) وزري،(6)عجمي،(7)K1، (8)K2، (9)K3، K4(10)، K5(11)، VC DNA marker(vivantis)(M) .

كما تباين عدد الحزم في الأصناف والطرز المدروسة حيث أعطى الطراز الكلابي K2 أعلى عدد من الحزم (237 حزمة) في حين أعطى الطراز الكلابي K1 أقل عدد من الحزم (204 حزمة) أما الطرز K3وK4 وK5 فقد أعطت أعداد متساوية من الحزم (231 حزمة). وقـد أعطى الصنف العجمي 19حزمة عند تطبيق زوج المرئسات LTR 6149F/Nikita-F وهو أعلى عدد من الحزم، في حين كان أقل عدد من الحزم هو حزمة واحدة في الصنف شكربارا عند تطبيق زوج المرئسات 5-LTR2R/3-LTR1F (الجدول،13).

كما اختلفت أزواج المرئسات المستخدمة في كشف التعددية الشكلية بين الأصـناف والطـرز المدروسة حيث أعطى زوجا المرئسـات LTR 6149F/ Sakkula-F و -5-LTR2R/3 LTR1F أعلى مستوى من التعدد الشكلي (100 %) حيث كانـت جميـع الحـزم الناتجـة وعددها14، 5 على التوالي متعددة شكلياً ، كما أعطى زوجا المرئسـات -LTR 6149F/3 LTR1F و 5-LTR1R/5-LTR2R أخفض مستوى من التعدد الشكلي (40%).

الجدول(13):عدد الحزم الناتجة عن المرئسات المستخدمة في تقنية IRAP في الأصناف والطرز المدروسة

الصنف / المرئسة	شكربار	التدمري	البلدي ماوردي	البلدي الحبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5	المجموع
TDK1	6	8	5	7	7	7	7	7	4	7	7	72
TDK2	8	9	6	8	7	9	8	9	9	7	8	88
TDK10	7	8	8	7	7	6	5	3	6	7	5	69
TDK11	5	4	5	7	7	5	4	5	6	4	7	59
TDK12	4	5	8	7	4	6	4	7	4	8	7	64
TDK13	8	6	5	7	6	7	8	6	8	8	8	77
LTR 6149F / LTR 6149F	7	7	7	7	7	8	6	7	6	7	9	78
LTR 6149F/ LTR 6150R	4	5	6	6	5	6	7	5	5	7	5	61
LTR 6149F/5-LTR1R	6	7	5	7	6	7	6	6	7	7	5	69
LTR 6149F5-LTR2R /	8	8	9	8	7	10	8	10	13	12	10	103
LTR 6149F/3-LTR1F	4	3	4	3	5	4	4	3	3	4	5	42
LTR 6149F/ Sakkula-F	7	3	11	13	2	11	11	13	11	9	9	100
LTR 6149F/ Nikita-F	17	15	12	12	15	19	16	17	16	18	16	173
LTR 6150R/ LTR 6150R	12	8	10	8	9	7	5	7	11	7	4	88
LTR 6150R/5-LTR1R	6	8	10	8	8	9	7	7	6	8	9	86
LTR 6150R/5-LTR2R	8	8	8	9	9	3	9	9	8	9	8	88
LTR 6150R/3-LTR1F	8	9	7	7	6	5	7	6	5	5	6	71
LTR 6150R/ Sakkula-F	9	11	10	9	6	8	10	12	10	11	10	106
LTR 6150R/ Nikita-F	9	8	10	7	9	9	5	9	8	10	10	94
5-LTR1R/5-LTR1R	6	5	7	4	5	5	6	6	5	6	7	62
5-LTR1R/5-LTR2R	4	4	4	4	4	5	4	4	4	4	4	45
5-LTR1R/ Sakkula-F	8	6	6	9	7	7	8	9	8	6	5	79
5-LTR1R/ Nikita-F	5	5	4	5	5	2	5	5	5	5	5	51
5-LTR2R/5-LTR2R	8	7	9	6	6	5	4	7	7	7	6	72
5-LTR2R/3-LTR1F	1	2	3	3	3	3	1	3	3	2	3	27
5-LTR2R/ Sakkula-F	12	11	7	10	11	13	5	11	11	10	12	113
5-LTR2R/ Nikita-F	7	10	9	9	10	7	8	9	10	6	8	93
3-LTR1F/3-LTR1F	5	4	4	4	3	4	2	5	3	3	4	41
3-LTR1F/ Sakkula-F	4	3	5	4	4	4	2	4	4	4	4	42
3-LTR1F/ Nikita-F	6	7	5	7	7	7	6	6	6	6	7	70
Sakkula-F/ Nikita-F	11	9	7	10	9	9	9	11	10	10	10	105
Nikita-F/ Nikita-F	10	6	9	10	8	9	7	9	9	7	8	92
المجموع	230	219	225	232	214	226	204	237	231	231	231	2480

بلغ متوسط النسبة المئوية للتعددية الشكلية في هذه الدراسة 74.4 %، وهي اخفض من النسبة الناتجة عند Branco ورفاقه عام 2007 (96 %) على الأرز ومن النسبة (86.3%) عند Guo وزملاؤه في عام2005 على الكاكي. وتقارب متوسط عدد الحزم لكل مرئسة في هذه الدراسة(10.75)حزمة مع المتوسط الذي توصل له Branco ورفاقه عام 2007 على الأرز (9.16) حزمة.

وكان متوسط عدد الحزم المتعددة شكلياً للزوج الواحد من المرئسات في هذه الدراسة 8.وهو أخفض مما وجده Tao ورفاقه في عام 2007 عند دراسة 56 نوع من الفطرالمشروم(11.11) وأعلى مما حصل عليه Guo وزملاؤه في عام2005(6 حزم متعددة شكلياً).

أعطت دراسات Teo ورفاقه عام 2005 على 16 صنف من الموز وباستخدام 16 زوج من المرئسات 118 حزمة متعددة شكلياً بينما بلغت في هذه الدراسة 256 حزمة متعددة شكلياً، ربما يعود ذلك إلى استخدام عدد أكبر من أزواج المرئسات في هذه الدراسة (33 زوج). كما يعزى العدد العالي من القطع المضخمة إلى ارتفاع عدد نسخ العناصر النقالة في الجينوم وإلى دورها المحتمل في بنية جينوم المشمش وعدد نسخها العالي في الجنس *Prunus*.

أعطت معظم المرئسات المستخدمة تضخيماً واضحاً باستثناء المرئسة Sakkula-F أي بنسبة97% وبمجموع 225.5 حزمة لكل عينة مدروسة مع مجموع أزواج المرئسات (32 زوج) بينما أعطت53.6 %من المرئسات التي استخدمها Alavi-kia ورفاقه عام2008 عند دراسته لجنس الزعفران تضخيماً واضحاً وبمعدل 65.9 حزمة لكل عينة وهذا مما يدل على وجود تشابه بين جينومي الشعير والمشمش في مناطق التكرارات الطرفية الطويلة LTR أكبر مما هوعليه بين الشعير والزعفران وكذلك قدرة معلّمات العناصر النقّالة (Retrotransposon)على الانتقال بين الأجناس المختلفة.

تراوح عدد القطع المضخمة الناتجة من أزواج المرئسات المستخدمة بين 5-24 قطعة بحجم تراوح بين 80-3000 زوج قاعدي بينما تراوح عدد القطع المضخمة في دراسة Alavi-kia ورفاقه في عام2008 على الزعفران بين 6-22 وبشكل مطابق لحجوم القطع الناتجة في هذه الدراسة وذلك عند استخدام أزواج المرئسات ذاتها التي تم استخدامها في هذه الدراسة.

ولاختبار التكرارية تمت إعادة التجربة فأظهرت هذه التقنية تكرارية عالية وبنسبة 100% ولعدة مرات مما يزيد من موثوقية ومصداقية هذه التقنية .

2-تحديد درجة التشابه الوراثية (Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة:

2-1-تحديد درجة التشابه الوراثية(Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنيةSSR:

تم تحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف و الطرز المدروسة بالاعتماد على معامل Jaccard (Jaccard Coeffeciant) (الجدول،14) حيث كانت أعلى درجة تشابه وراثية بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي (0.69) و أقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلدي ماوردي و العجمي (0.27)، بمتوسط درجة تشابه 0.48 بين كافة الأصناف والطرز المدروسة، ويلاحظ بشكل واضح انخفاض درجة التشابه الوراثية بين الصنف العجمي وسائر الأصناف والطرز المدروسة فقد كانت أقل درجة تشابه وراثية مع الصنف البلدي الماوردي (0.27) وأعلاها مع الطراز K5 (0.54) بمتوسط درجة تشابه 0.41 و هي أقل من المتوسط العام لدرجة التشابه (0.48). وقد يعزى ذلك إلى ابتعاد هذا الصنف في معظم صفاته الشكلية عن بقية الأصناف والطرز المدروسة من حيث لون الثمرة الأبيض المصفر قليلاً وحجمها الكبير مع الصلابة الجيدة إضافة لظاهرة اختزال المبايض المتواجدة في هذا الصنف فقط (الغماز والمطر،2004).

لوحظ أيضاً بشكل واضح ارتفاع درجة التشابه الوراثية بين طرز الكلابي المدروسة فيما بينها فقد كانت أعلى درجة تشابه وراثية بين الطرازين K4 وK5(0.58) وأقلها بين الطرازين K2 وK5 والطرازين K1وK4 (0.33) و بمتوسط درجة تشابه 0.46، وهذا يعلل بكون هذه الطرز هي انعزالات لنسل صنف واحد هو الكلابي.

حصل Zhebentyayeva ورفاقه عام 2003 على متوسط أعلى(0.70) من التشابه الوراثي لأربعة وسبعين صنف من المشمش مقارنة بمتوسط درجة التشابه في هذه الدراسة، كما وجد Romero وزملاؤه عام 2003 عند دراسة التشابه الوراثي بين أربعين صنف من المشمش أعلى درجة تشابه 0.73 وهي أعلى من نتيجة هذه الدراسة ولكن كانت أقل درجة تشابه وراثية 0.06 أقل بكثير من أقل درجة تشابه تم الحصول عليها في هذه الدراسة(0.27)، وقد يعود السبب في هذه الفروقات إلى الاختلاف في المادة النباتية المدروسة من حيث منطقة النشوء أو التوزع الجغرافي أو قد يعود السبب إلى اختلاف المرئسات المستخدمة وقدرتها في كشف التباينات الوراثية.

الجدول(14): درجة التشابه الوراثية بين اصناف و طرز المشمش المدروسة باستخدام تقنية SSR بالاعتمـاد علـى معامل Jaccard

	شكربارا	تدمري	بلدي ماوردي	بلدي حبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5
شكربارا	1										
تدمري	0.453	1									
بلدي ماوردي	0.422	0.326	1								
بلدي حبي	0.488	0.567	0.386	1							
وزري	0.442	0.552	0.377	0.686	1						
عجمي	0.386	0.318	0.270	0.288	0.341	1					
K1	0.4	0.472	0.4	0.472	0.459	0.325	1				
K2	0.386	0.567	0.355	0.348	0.341	0.289	0.472	1			
K3	0.428	0.540	0.5	0.540	0.487	0.390	0.486	0.390	1		
K4	0.422	0.525	0.391	0.525	0.476	0.386	0.333	0.386	0.442	1	
K5	0.536	0.463	0.431	0.463	0.487	0.538	0.486	0.333	0.475	0.575	1

2-2-تحديد درجة التشابه الوراثية(Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية IRAP:

تم استخدام معامل Jaccard (Jaccard Coeffeciant) لتحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف و الطرز المدروسة (الجدول،15) حيث كانت أعلى درجـة تشـابه وراثيـة بـين الطرازين K4 و K5 (0.78) و أقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلـدي مـاوردي و الوزري (0.55) و بمتوسط درجة تشابه 0.67.

لوحظ بشكل واضح انخفاض درجة التشابه الوراثية بين الصنف البلـدي مـاوردي و سـائر الأصناف والطرز المدروسة فقد كانت أقل درجة تشابه وراثية مع الصنف الـوزري (0.55) وأعلاها مع الطراز K3 (0.62) وبمتوسط درجة تشابه 0.59 وهي أقل من المتوسـط العـام لدرجة التشابه (0.67) وقد يعود ذلك إلى أن هذا الصنف هو الوحيد مـن بـين الأصـناف والطرز المدروسة الذي يحمل صفة البذرة اللاصقة (الغماز والريس،1992).

أوضحت النتائج أيضاً ارتفاع درجة التشابه الوراثية بين طرز الكلابي المدروسة فيما بينهـا فقد كانت أعلى درجة تشابه وراثية (0.78) بين الطرازين K4 و K5 وأقلها (0.66) بـين الطرازين K1 و K5 و بمتوسط درجة تشابه 0.72 و هي أعلى من المتوسط العام لدرجـة التشابه (0.67)، وهذا ماتؤكده الصفات الشكلية المشتركة بين هذه الطرز من حيث قوة النمو واللون البرتقالي للثمرة مع صغر حجمها والبذرة المرة (الغمازو المطر،2004).

وبمقارنة نتائج هذه الدراسة مع الدراسات السابقة نجد أن متوسط درجـة التشـابه الوراثيـة (0.67) أقل مما قد ذكره Branco وزملاؤه عام 2007 على الرزوهي(0.74) وعندGuo وآخرون عام 2005 على الكاكي وهي (0.79). كما نجد أن الحد الأعلـى لدرجـة التشـابه

الوراثية (0.78) أقل من الحد الأعلى المذكور من قبل كل من Guo ورفاقه (2005) وBranco ورفاقه (2007) وهي 0.99 و0.98 على التوالي.إضافة إلى أن الحد الأدنى لدرجة التشابه الوراثية (0.55) أعلى من الحد الأدنى المذكور في الدراستين السابقتين وهي 0.48 و0.17 على التوالي، وقد تعود هذه الاختلافات إلى اختلاف المادة النباتية المدروسة من حيث منطقة النشوء والتوزع الجغرافي وكذلك المرئسات المستخدمة في التقنية.

الجدول (15): درجة التشابه الوراثية بين اصناف و طرز المشمش المدروسة باستخدام تقنية IRAP بالاعتماد على معامل Jaccard

	شكربارا	تدمري	بلدي ماوردي	بلدي حبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5
شكربارا	1										
تدمري	0.740	1									
بلدي ماوردي	0.608	0.574	1								
بلدي حبي	0.692	0.715	0.592	1							
وزري	0.688	0.739	0.546	0.763	1						
عجمي	0.695	0.636	0.605	0.653	0.642	1					
K1	0.669	0.692	0.571	0.683	0.646	0.641	1				
K2	0.717	0.714	0.615	0.724	0.670	0.684	0.690	1			
K3	0.740	0.751	0.623	0.702	0.686	0.644	0.680	0.733	1		
K4	0.733	0.692	0.611	0.678	0.648	0.669	0.693	0.671	0.705	1	
K5	0.701	0.692	0.594	0.660	0.648	0.644	0.660	0.671	0.674	0.777	1

3-2 تحديد درجة التشابه الوراثية(Genetic similarity) بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنيتيSSR و IRAP معاً:

تم استخدام معامل Jaccard (Jaccard Coeffeciant) لتحديد درجة التشابه الوراثية بين الأصناف و الطرز المدروسة (الجدول،16) حيث كانت أعلى درجة تشابه وراثية(0.75) بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي وأقل درجة تشابه وراثية (0.52) بين الصنفين البلدي ماوردي والوزري وبمتوسط درجة تشابه 0.64.

توافقت بيانات التشابه الناتجة عن هذه الدراسة مع المواصفات الشكلية والزراعية للأصناف والطرز المدروسة حيث أكدت درجة التشابه العالية بين الصنفين الوزري والبلدي الحبي التماثل العالي بينهما في الصفات الشكلية والإنتاجية والكيميائية مثل الباكورية بالإنتاج وشكل الثمرة المسطح ذات اللون الأصفر مع الخد الأحمر ودرجة الصلابة المتوسطة مع صفة البذرة الحلوة المنفصلة. أما بالنسبة للصنفين البلدي الماوردي والوزري ارتبطت نسبة التشابه المنخفضة بينهما مع الاختلاف بالصفات من حيث قوة النمو(قوي،متوسط على التوالي)، لون

الثمرة(برتقالي مع عدم وجود خد أحمر،أصفر مع وجود الخد الأحمر بنسبة 12 % على التوالي) ومن حيث التصاق البذرة (لاصقة، منفصلة على التوالي) (الغمازو المطر،2004).

الجدول (16): درجة التشابه الوراثية بين اصناف و طرز المشمش المدروسة باستخدام تقنيتي IRAP و SSR بالاعتماد على معامل Jaccard

	شكربارا	تدمري	بلدي ماوردي	بلدي حبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5
شكربارا	1										
تدمري	0.700	1									
بلدي ماوردي	0.582	0.540	1								
بلدي حبي	0.665	0.697	0.565	1							
وزري	0.653	0.714	0.523	0.753	1						
عجمي	0.651	0.592	0.556	0.602	0.599	1					
K1	0.633	0.664	0.549	0.658	0.622	0.599	1				
K2	0.670	0.696	0.580	0.673	0.624	0.628	0.663	1			
K3	0.697	0.724	0.607	0.682	0.660	0.637	0.656	0.663	1		
K4	0.688	0.667	0.580	0.658	0.625	0.623	0.642	0.656	0.668	1	
K5	0.679	0.661	0.573	0.634	0.627	0.631	0.639	0.642	0.649	0.750	1

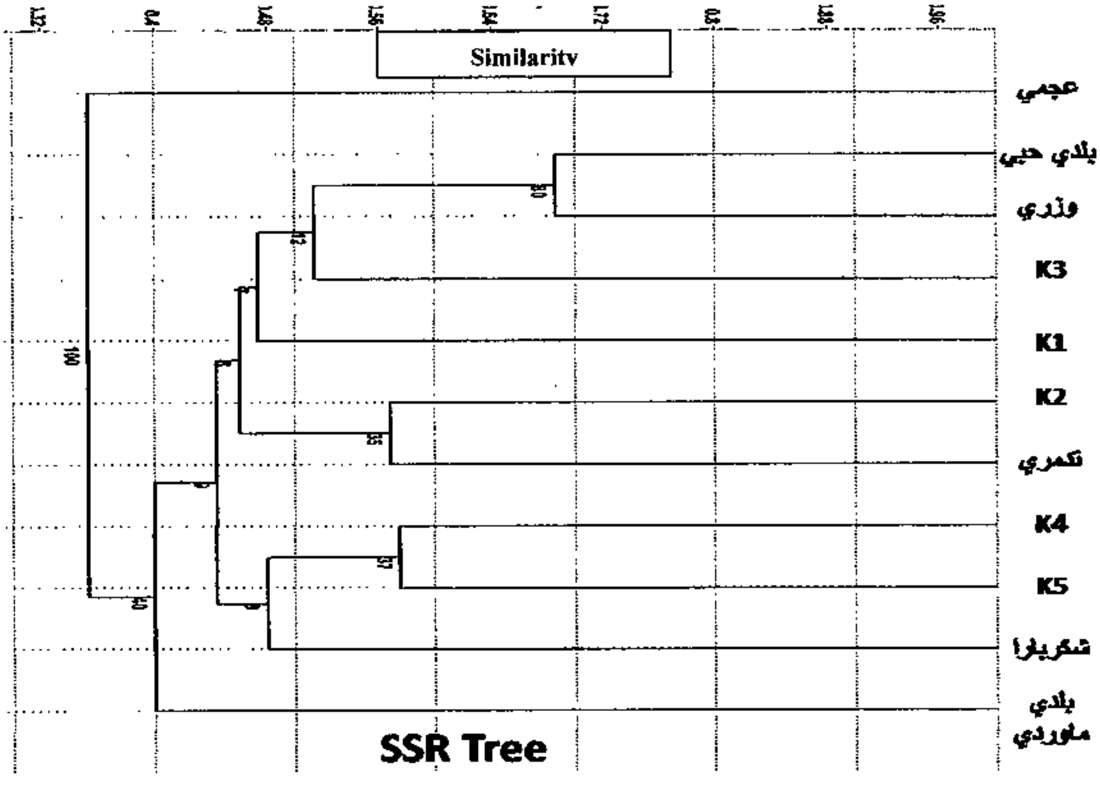
3- التحليل العنقودي (cluster analysis) للأصناف والطرز المدروسة:

يسمح التحليل العنقودي بتقسيم الأصناف والطرز المدروسة إلى مجموعات، وتعكس هذه المجموعات درجة التشابه الوراثية فيما بينها، وقد تتجمع الأصناف المدروسة ضمن مجموعة واحدة وفقاً لموطنها الجغرافي، أو وفقاً للأصل والنسب(Hormaza, 2002).

3-1-التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنية SSR :

وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية SSR أصناف وطرز المشمش المدروسة في عنقودين رئيسين على درجة تشابه 0.43 وهذا التوزع تدعمه قيمة bootstrab بلغت 8 % وبقي الصنفان البلدي الماوردي والعجمي مستقلين خارج العنقودين كل على حده (الشكل،11) احتوى العنقود الرئيسي الأول ستة أصناف ويمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين على درجة تشابه 0.46 وقيمة bootstrab بلغت 7 % تضمن تحت العنقود الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري على درجة تشابه 0.66 عند قيمة عالية من الموثوقية حيث كانت قيمة bootstrab 80 % بالإضافة للطرازين K3 و K1 واحتوى تحت العنقود الثاني الصنف التدمري مع الطراز K2 على درجة تشابه 0.57 وقيمة bootstrab بلغت 37 % واحتوى العنقود

الرئيسي الثاني كل من الطرازين K4 و K5 على درجة تشـابه 0.58 وقيمـة bootstrab تساوي37% والصنف شكربارا جاء منفرداً . لقد تمت ملاحظة المستوى العالي من الموثوقية في تحليل bootstrab بقيمة 100% وذلك عند الصنف العجمي فقط.

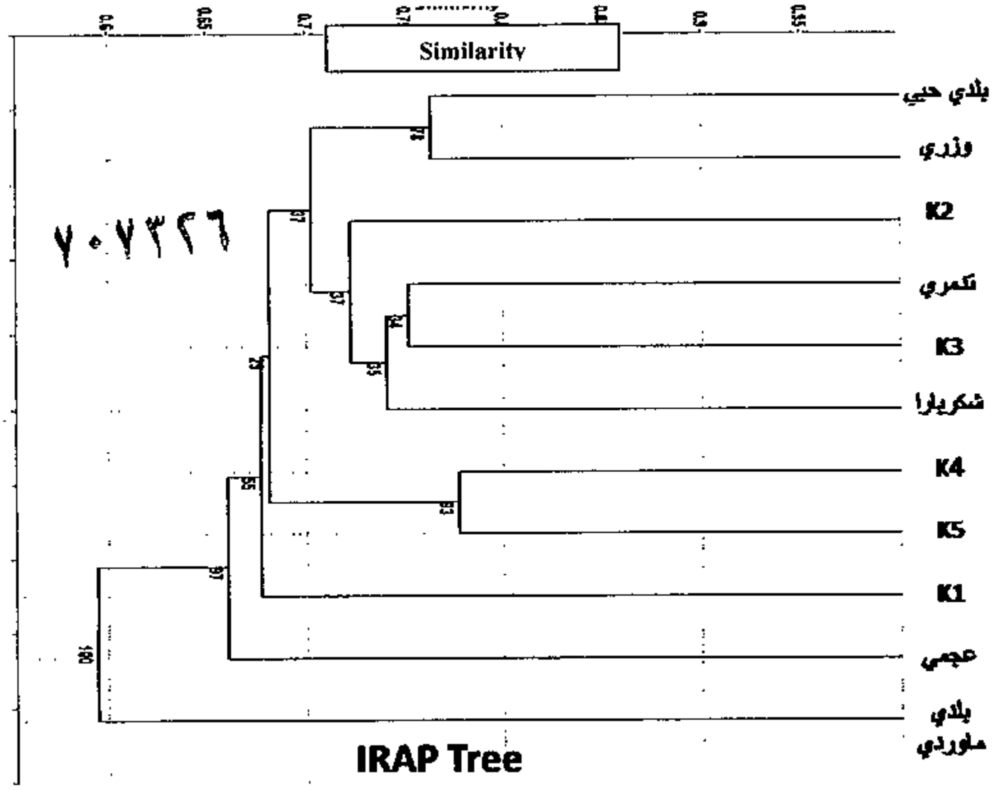


الشكل(11): مخطط التحليل العنقودي للأصناف المدروسة الناتج عن تقنية SSR , بالاعتمـاد علـى معامل Jaccard ، من خلال طريقة UPGMA.

3-2- التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنية IRAP :

وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية IRAP أصناف وطرز المشـمش المدروسـة إلـى عنقودين رئيسين على درجة تشابه 0.67 وقيمة bootstrab بلغت25 % وانفصـل عنهمـا الطراز K1 على قيمة bootstrab تساوي55 % والصنف العجمي على قيمة عالية 97% كل على حده والبلدي الماوردي بقي متميزاً عن المجموع بموثوقية عاليـة 100% فـي تحليـل bootstrab (الشكل،12):احتوى العنقود الأول ستة أصناف وطرز وراثية وأمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين على درجة تشابه0.70 احتوى تحت العنقود الأول الصـنفين البلـدي الحبـي والوزري على درجة تشابه 0.76 وقيمة bootstrab 78% أما تحت العنقود الثاني فقد شمل الصنف التدمري مع الطراز K3 على درجة تشابه0.75 والصنف شكربارا والطراز K2 كل

على حده أما العنقود الرئيسي الثاني فشمل الطرازين K4 وK5 على درجة تشابه 0.77 وقيمة موثوقية عالية من bootstrab(93%).



الشكل (12): مخطط التحليل العنقودي للأصناف المدروسة باستخدام تقنيةIRAP بالاعتماد على معامل Jaccard ، من خلال طريقة UPGMA.

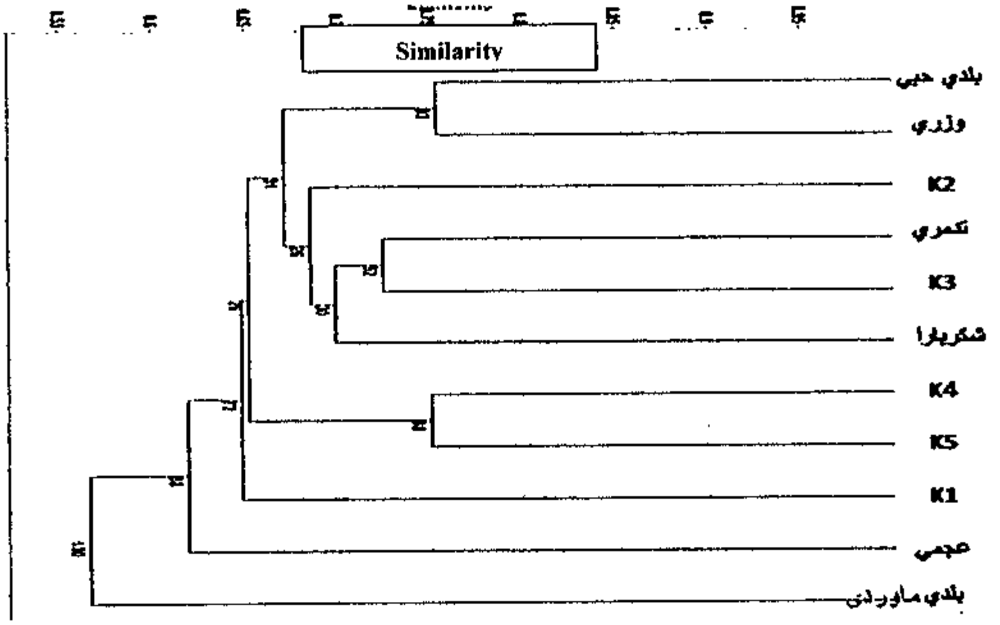
3-3-التحليل العنقودي الناتج عن استخدام تقنيتي SSR وIRAP معاً

تطابق التحليل العنقودي الناتج عن استخدام كلتا التقنيتين معاً مع التحليل العنقودي الناتج عن تقنية IRAP مع اختلافات بسيطة بدرجات التشابه ويعلل ذلك بالعدد العالي من المعلّمات الناتجة عن تقنية IRAP (344) مقارنة مع تقنيةSSR (78) لذا فقد وزع التحليل العنقودي الناتج عن تقنيتي SSR وIRAP معاً (الشكل،13) أصناف وطرز المشمش المدروسة إلى عنقودين رئيسين على درجة تشابه 0.65 وقيمة bootstrab تساوي26 %وانفصل عن العنقودين الرئيسين كل من الطراز K1 والصنف العجمي (قيمة bootstrab 72 %و98 % على التوالي) وكذلك البلدي الماوردي بقي متميزاً عن المجموع بسوية عالية من الموثوقية وهي100 %.حيث احتوى العنقود الأول ستة أصناف وطرز وراثية وأمكن تقسيمه إلى تحت عنقودين على درجة تشابه0.67 احتوى تحت العنقود الأول الصنفين البلدي الحبي والوزري على درجة تشابه 0.75 أما تحت العنقود الثاني فقد شمل الصنف التدمري مع الطراز K3

على درجة تشابه0.72 والصنف شكربارا والطراز K2 كل على حده أما العنقــود الرئيســي الثاني فشمل الطرازين K4 وK5 على درجة تشابه 0.75 .

أظهرت نتائج هذه الدراسة أن الأصناف ذات درجة التشابه 0.70 فما فوق كان لهــا صــفة البذرة المنفصلة ،كما أن الصنفين البلدي الحبي والبلدي الماوردي كانا مرتبطين مع بعضــهما بدرجة تشابه 0.57 وهي أقل من درجة ارتباطهما مع الأصــناف والطــرز الأخــرى إذ أن الصنف البلدي الحبي له درجة تشابه عالية مع الصنف الوزري إشارة إلــى تشــابه نســب محتملة.

كما وأظهرت نتائج هذه الدراسة بأن الصنفين العجمي والبلدي الماوردي لا يشكلان أي عنقود مع أي صنف آخر وهما يتميزان عن الجميع بسهولة مما يؤكد بأنهما مختلفين وراثياً بشــكل كبير عن الأصناف والطرز الأخرى.



الشكل (13): مخطط التحليل العنقودي للأصناف المدروسة باستخدام تقنيتي SSR وIRAP , و بالاعتماد على معامل Jaccard ، من خلال طريقة UPGMA.

4- تمييــز الأصــناف والطــرز باســتخدام الواســمات الفريــدة (uniqe bands) النــاتجة عن استخدام تقنيــةSSR:

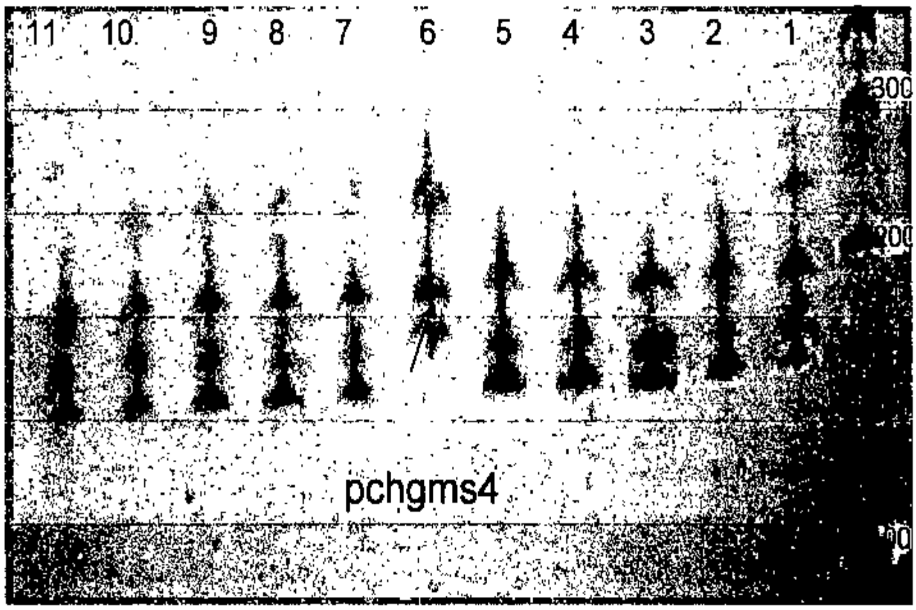
تمكنت تسعة أزواج من المرئسات من بين أزواج المرئسات الست وعشرين المستخدمة فــي تقنيــة SSR مــن وســم بعــض الأصــناف والطــرز المدروســة بـــ14 واســم فريد(الجدول،17والأشكال,14,15,16) حيث ميــزت أزواج المرئســاتUDP98-411 ، UDP98-405وPchgms4 الصنف العجمي بأليل فريد لكل منها، بينما تميز الصنف البلدي ماوردي بأليلين فريدين باستخدام زوج المرئسة UDP96- 019 و أليــل فريــد باســتخدام

Pchgms12، واستطاع زوج المرئسةUDP98-412 تمييزصنف الشكربارا بأليل فريد أما زوج المرئسة UDP96-008 ميّز كل من الصنف العجمي والطرازين K1وK2 بأليل فريد لكل منها وكذلك زوج المرئسةUDP97-402 ميّز الشكربارا والطراز K2 بأليل فريد لكل منهما وزوج المرئسة Pchgms5 حيث ميز كل من الصنفين العجمي والشكربارا بأليل فريد لكل منهما، وبالتالي يمكن استخدام هذه الواسمات الفريدة في عمليات التصنيف النباتي لغراس المشمش في البنوك الوراثية أو في حقول المزارعين لدراسة مدى انتشار صنف أو طرازمعين من المشمش.

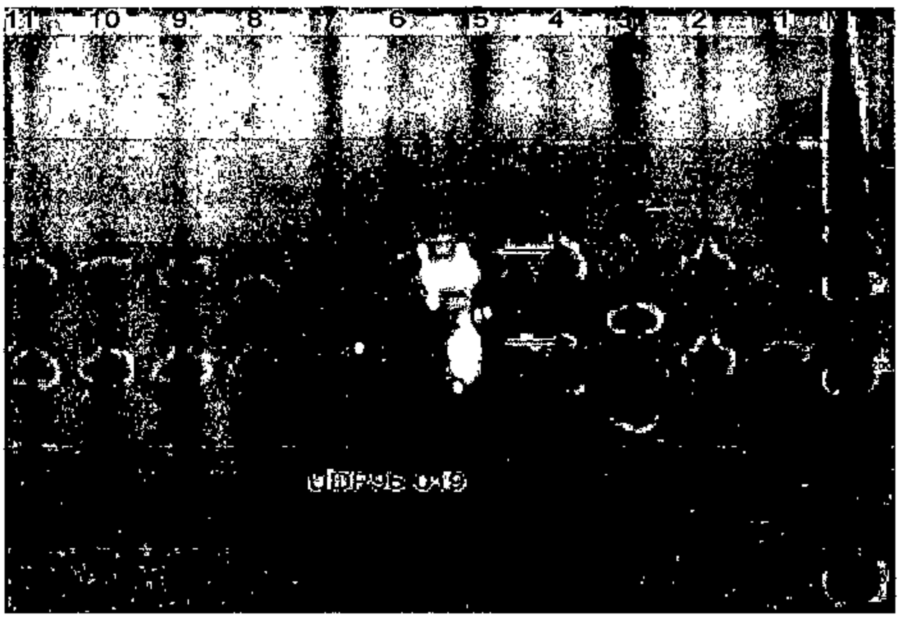
حصل Zhebentyayeva ورفاقه (2003) على الأليلات الفريدة في الأصناف الصينية فقط من أصناف المشمش التي تمت دراستها وذلك عند استخدام أزواج المرئسات Pchgms12، Pchgms14،Pchgms5 ولم تظهر أية واسمات فريدة في المجموعات الجغرافية الأخرى للمشمش.

الجدول (17): اسماء المرئسات التي أعطت الواسمات الفريدة وعدد الواسمات الفريدة وحجمها مع أسماء الأصناف والطرز التي ميزتها هذه الواسمات في تقنيةSSR.

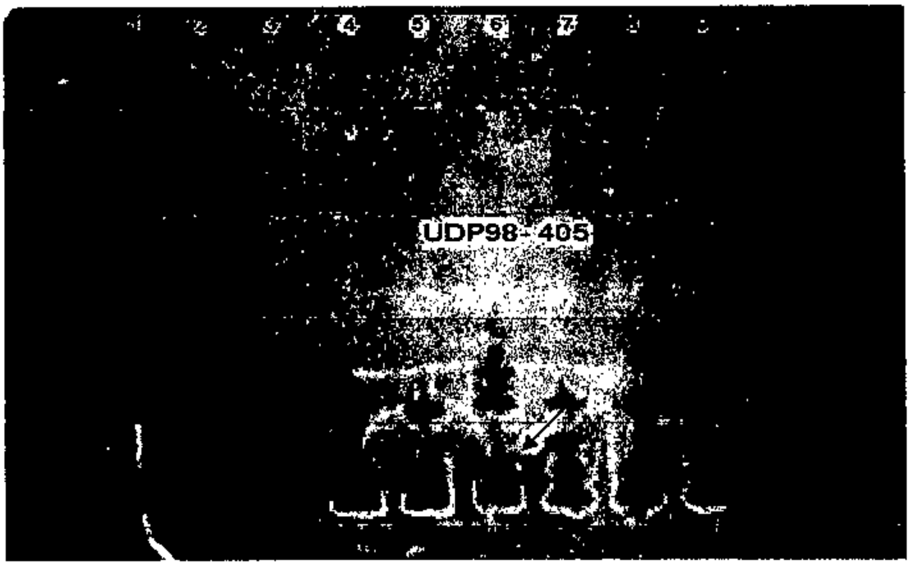
أزواج المرئسات	عددالأليلات الفريدة	الصنف/الطراز	حجم الأليل الفريد(زوج قاعدي)
UDP98-411	1	العجمي	160
		العجمي	120
		K1	130
UDP96-008	3	K2	140
		شكربارا	160
UDP97-402	2	K2	170
UDP98-405	1	العجمي	120
		البلدي ماوردي	180
UDP96-019	2	البلدي ماوردي	200
UDP98-412	1	شكربارا	110
Pchgms4	1	العجمي	170
		العجمي	240
Pchgms5	2	شكربارا	300
Pchgms12	1	البلدي ماوردي	500
المجموع	14		



الشكل(14): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات pchgms4 بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنيةSSR حيث:(1):شكربارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5): وزري،(6):عجمي،(7):K1 ،(8):K2، (9):K3، (10):K4، (11)K5 (M) المعلم القياسي 100bpوتمت الإشارة إلى الواسمات الفريدة بالأسهم.



الشكل(15): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات UDP96-019في الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية SSRحيث:(1):شكربارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5) وزري،(6)عجمي،(7):K1 (8):K2 (9):K3 (10):K4 (11):K5.(M) المعلم القياسي 100bpو تمت الإشارة إلى الواسمات الفريدة بالأسهم.



الشكل(16): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات UDP98-405بين الأصناف والطرز المدروسة باستخدام تقنية SSRحيث:(1):شكربارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5): وزري،(6):عجمي،(7):K1 (8):K2 (9):K3 (10):K4 (11):K5.(M): المعلم القياسي 100bp وتمت الإشارة إلى الواسمات الفريدة بالأسهم.

5- تمييز الأصناف والطرز باستخدام الواسمات الفريدة (uniqe bands) الناتجة عن استخدام تقنية IRAP :

استطاعت تقنية IRAP تمييز أربعة من الطرز الوراثية الخمس من المشمش الكلابي وجميع الأصناف المدروسة بـــ 35 واسم فريد(الجدول،18) حيث تميز الصنف البلدي ماوردي بأعلى عدد من الواسمات الفريدة(10) ثم تلاه الطراز K2 بتسعة واسمات والصنف البلــدي الحبــي بأربعة واسمات والصنف العجمي بثلاثة واسمات وتساوى الصـــنفان شــكربارا والتــدمري والطرازان K3 و K5 بواسمين فريدين، بينما تم وسم الطراز K1 بواسم فريد وحيد.

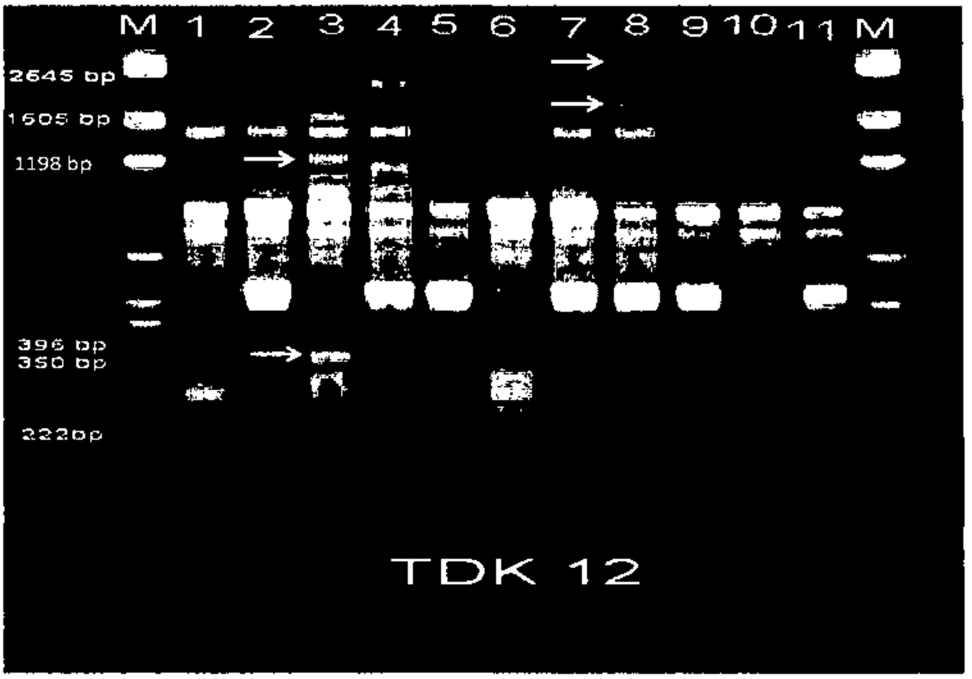
تمكن 18 زوج من المرئسات من بين 33 زوج من المرئسات المستخدمة في تقنيــة IRAP من إعطاء واسمات فريدة حيث تميز زوج المرئسات LTR6150/5-LTR1 بإعطاء أعلى عدد مــن الواســمات الفريــدة (5) فــي حــين أعطــى زوج المرئســةTDK12 أربعــة واســمات(الشــكل،17) وتســاوت أزواج المرئســاتLTR6149/Nikita و 5 LTR1- (الشــكل،18) وNikita بعــدد الواســمات(3) أعطـــى كـــل مـــن أزواج المرئســـات TDK2(الشكل،19)،LTR6150/5-LTR2، 5-LTR2،5-LTR2/Nikita واسمين فريدين، في حين أعطى كل من LTR6150،LTR6149/5-LTR1 ، LTR6149/5-LTR2 ، 3-

3- ، 3-LTR1، 5-LTR2/3-LTR1، LTR6150/Sakkula، LTR6150/LTR1
LTR1/Sakkula و3-LTR1/Nikita واسم وحيد.

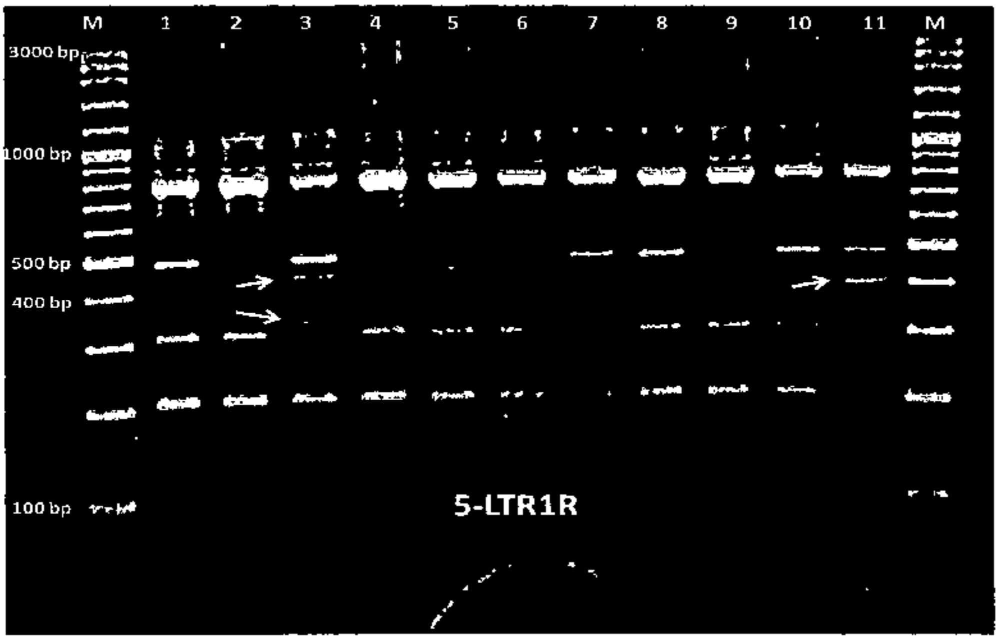
مكنت هذه التقنية من ايجاد مؤشرات متخصصة لتمييز هذه الأصناف والطرز المدروسة، لذلك تعتبر هذه الواسمات مؤشرات متخصصة ومميزة للصنف أو الطراز إذ أن هذه القطع تواجدت في طراز أو صنف معين وغابت من الطرز والأصناف الأخرى(الجدول،18). فعلى سبيل المثال، نجد بأن تحليل صنف الشكربارا باستخدام زوج المرئسة Nikita يعطي 10 حزم منها حزمة وحيدة من الدنا DNA ذات وزن جزيئي 400 زوج قاعدي وجدت في هذا الصنف فقط ولم توجد في بقية الأصناف والطرز الأخرى، وقد أعطى زوج المرئسات ذاته مع الصنف البلدي الحبي حزمتان فريدتان (1000,900زوج قاعدي) لم تتطابقا في وجودهما أو وزنهما الجزيئي مع أي صنف أو طراز آخر وبالتالي يمكن استخدام هذه الواسمات الفريدة وبشكل مكمل للصفات الشكلية في عمليات التصنيف النباتي لغراس وأشجار المشمش في المشاتل والبنوك الوراثية وحقول الفلاحين لدراسة مدى انتشار صنف أو طراز معين من المشمش وتحديد الأصناف والطرز المهددة بالانقراض.

الجدول (18): أسماء المرئسات التي أعطت الواسمات الفريدة وعدد هذه الواسمات ووزنها الجزيئـي مـع أسماء الأصناف والطرز التي ميزتها هذه الواسمات في تقنيةIRAP

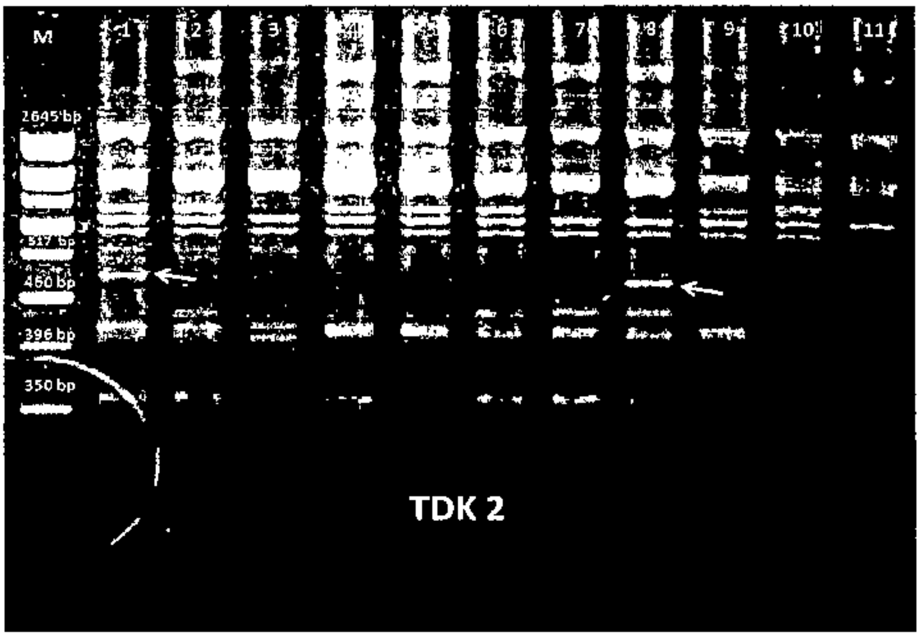
K5	K4	K3	K2	K1	عجمي	وزري	بلدي حبي	بلدي ماوردي	تدمري	شكربارا	المرئسة/الصنف
			470							485	TDK2
			2000 / 2700					350 / 1200			TDK12
			320								LTR6149/5-LTR1
				250							LTR6149/5-LTR2
			420				450 / 680				LTR6149/Nikita
								280			LTR6150
			80		50 / 550			250	600		LTR6150/5-LTR1
			180		90						LTR6150/5-LTR2
									800		LTR6150/3-LTR1
			350								LTR6150/sakkula
400								310 / 450			5-LTR1
								500 / 850			5-LTR2
		300									5-LTR2/3-LTR1
		2000						600			5-LTR2/ Nikita
			330								3-LTR1
								850			3-LTR1/sakkula
260											3-LTR1/ Nikita
							900 / 1000			400	Nikita
2	0	2	9	1	3	0	4	10	2	2	المجموع



الشكل(17): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات TDK12بين الأصناف والطرز المدروسة حيث:(1):شكربارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5): وزري،(6):عجمي،(7):K1 (8):K2 (9):K3 (10):K4 (11) PGEM marker(M).K5وتشير الأسهم إلى الواسمات الفريدة.



الشكل(18): نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات 5-LTR1Rبين الأصناف والطرز المدروسة حيث:(1):شكربارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5): وزري،(6):عجمي،(7):K1 (8):K2 (9):K3 (10):K4 (11)K5.(M) VC DNA marker(vivantis)-وتشير الأسهم إلى الواسمات الفريدة.



الشكل(19):نماذج الواسمات الفريدة الناتجة عن زوج المرئسات TDK2 بين الأصناف والطرز المدروسة حيث:(1):شكربارا،(2):تدمري،(3):بلدي ماوردي ، (4): بلدي حبي،(5): وزري،(6):عجمي،(7):K1 (8):K2 (9):K3 (10):K4 (11) K5. PGEM marker (M) تشير الأسهم إلى الواسمات الفريدة.

6-حساب معدل التغاير الموروثي المتوقع H_e وقيمة التغاير الموروثي الملحوظة H_o في تقنية SSR :

تم حساب متوسط قيمة التغاير الموروثي المتوقع H_e (Expected heterozygosity)، وتم حساب قيمة التغاير الموروثي الملحوظة H_o (Observed heterozygosity) في تقنية SSR. إذ تراوحت قيم التغاير الموروثي المتوقعة بين 0 و 0.71 وبمتوسط 0.48 وهذه القيمة كانت أعلى مما وجده Cipriani وآخرون عام 1999 على الدراق(0.32) وعند Romero وآخرون عام 2003 على المشمش(0.32) ومطابقة للنتيجة التي تم الحصول عليها Wunsch و Hormaza عام 2002(0.49) على الكرز الحلو وأقل مما حصل عليه Maghuly ورفاقه عام 2005 على المشمش (0.61) ويعزى ارتفاع قيمة التغاير الموروثي في المشمش مقارنة مع الدراق إلى ارتفاع الدرجة المعنوية من عدم التوافق الذاتي الملحوظ في المشمش مقارنة مع الدراق(Romero *et al.*, 2003).

أما نسبة التغاير الموروثي الملحوظ(وهي نسبة الأفراد غير المتجانسة بين الأفراد المدروسة) كانت 0.29 حيث تراوحت بين 0 و 0.91 وهذه القيمة أقل مما تمت ملاحظته عند Mnejja عام 2005 و 2004 حيث بلغت 0.73 و 0.65 على التوالي.

7-مقارنة كفاءة تقنيتي SSR وIRAP في تحليل جينوم أصناف وطرز المشمش المدروسة:

تمت مقارنة فعالية كلتا التقنيتين SSR وIRAP من خلال مقارنة كل من عدد الحزم الكلية الناتجة عن كل تقنية، وعدد الحزم الناتجة في كل صنف وطراز مدروس، والنسبة المئوية للتعددية الشكلية(polymorphism%)، والنسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً مع كل زوج من المرئسات، ومتوسط عدد الحزم الناتجة عن كل زوج من المرئسات(Multiplex ratio)، كما تم حساب معامل الارتباط(correlation cofficient) بين درجات التشابه الوراثي الناتجة عن كل تقنية.

٧٠٧٣٣٦

أعطت أزواج المرئسات الاثنين وثلاثين المستخدمة في تقنية IRAP ما مجموعه344 حزمة في الأصناف والطرز كافة بمعدل 10.75 حزمةً لكل زوج من المرئسات(Multiplex ratio)،كان من بينها 256 حزمةً متعددةً شكلياً أي بنسبة مئوية للتعددية الشكلية بلغت 74.4 %وبمعدل 2.25 % لكل زوج من المرئسات(الجدول،19)، واختلف عدد الحزم في الأصناف والطرز المدروسة حيث اعطى الطرازK2 أعلى عدد من الحزم (237)، في حين اعطى الطراز K1 أقل عدد من الحزم(204)، كما أعطت كل من الطرز K3 وK4وK5 أعداد حزم متماثلة (231) (الجدول،20).

أما في تقنية SSR فقد أظهرت أزواج المرئسات الست والعشرون المستخدمة ثمانية وسبعين أليلاً في الأصناف والطرز كافة كان منها 72 أليل متعدد شكلياً بنسبة مئوية للتعددية شكلية بلغت 92.3%، وتراوح عدد الأليلات في المواقع المختلفة بين 1-6 أليلات بمعدل 3 أليل في كل موقع(Multiplex ratio) وبنسبة تعددية شكلية 3.55 % لكل زوج من المرئسات (الجدول،19)، كما اختلف عدد الأليلات في أصناف و طرز المشمش المدروسة، حيث تراوح عددها بين 32 و 38 أليل أقلها في الطراز K1 و أعلاها في الصنفين شكربارا و البلدي الماوردي وفي الطراز K4 (الجدول،20).

نجد مما سبق أن متوسط عدد الحزم الناتجة عن كل زوج من المرئسات Multiplex ratio في تقنية IRAP (10.75) أعلى مما هوعليه في تقنية SSR(3)، في حين كانت النسبة المئوية للتعددية الشكلية (92.3 %) والنسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً في كل زوج من المرئسات(3.55%) في تقنية SSR أعلى مما هو في تقنيةIRAP (حيث كانت 74.4 %و2.25 % على التوالي)(الجدول،19).

ويعود تفسير ذلك إلى العوامل المختلفة المتعلقة بالجينوم، وبالمرئسات المستخدمة مثل تكرارية السلاسل المكملة للمرئسة في الجينوم، وبعدد النيكلوتيدات في كل زوج من المرئسات،

ويختلف ذلك بحسب التقنية المستخدمة والذي يحكم إمكانية إيجاد السلاسل المكملة ضمن الجينوم المدروس، وبالتالي عدد الحزم الناتجة، إذ أن مناطق التكرارت الطرفية الطويلة ذات تكرارية مرتفعة في الجينوم أما مرئسات SSR فهي مصممة بناء على مواقع محددة في الجينوم محيطة بموقع تكراريات التسلسلات البسيطة (flanking regions)، لذلك يكون عدد الحزم الناتجة عن كل زوج من المرئسات (Multiplex ratio) في تقنية SSR أخفض مما هو في تقنية IRAP ،أما النسبة المئوية للتعددية الشكلية، ونسبة الحزم المتعددة شكلياً في كل مرئسة فتكون في تقنية SSR أعلى مماهو في تقنية IRAP .

الجدول (19) :عدد الحزم الكلية وعدد الحزم المتعددة شكلياً ،وعدد الحزم الناتجة عن كل مرئسة والنسبة المئوية للتعددية الشكلية والنسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً في كل زوج من المرئسات في كلتا التقنيتين

التقنية	عدد الحزم الكلي	عدد الحزم المتعددة شكلياً	عدد الحزم الناتجة عن كل مرئسة Multiplex ratio	النسبة المئوية للتعددية الشكلية	النسبة المئوية للحزم المتعددة شكلياً في كل مرئسة
SSR	**78**	**72**	**3**	**92.3**	**3.55**
IRAP	**344**	**256**	**10.75**	**74.4**	**2.25**

الجدول(20): عدد الحزم الناتجة في كل صنف وطراز وراثي في كلتا التقنيتين SSR وIRAP

الصنف / التقنية	شكربارا	تدمري	بلدي ماوردي	بلدي حبي	وزري	عجمي	K1	K2	K3	K4	K5	المجموع
SSR	**38**	**35**	**38**	**34**	**34**	**36**	**32**	**36**	**34**	**38**	**37**	**392**
IRAP	**230**	**219**	**225**	**232**	**214**	**226**	**204**	**237**	**231**	**231**	**231**	**2480**

تم حساب معامل الارتباط بين التقنيتين بالاعتماد على درجة التشابه الوراثية الناتجة، حيث بلغت قيمة معامل الارتباط بين مصفوفتي التشابه الوراثي للتقانتين (r=0.57) وهذا يدل على موافقة ضعيفة بينهما.

ومن خلال نتائج التوصيف الجزيئي التي تم الحصول عليها في دراسة الأصناف والطرز المحلية استطاعت كل من تقنيتي SSR وIRAP تمييز الأصناف والطرز المحلية المدروسة بشكل واضح، وبالتالي إمكانية اعتماد هاتين التقنيتين في التوصيف الجزيئي للأصناف بهدف تعريف المصادر الوراثية المحلية ، وتقييم المجمعات الوراثية.

الفصل الرابع

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions and recommendations

الفصل الرابع

الاستنتاجات و التوصيات

Conclusions and recommendations

الاستنتاجات:

1-أثبتت تقنيتا SSR وIRAP فعالية في كشف التباينات الوراثية بين الأصناف والطرز المدروسة حيث أعطت تقنية SSR تعددية شكلية بمعدل 92.3 %بين الأصناف والطرز المدروسة، في حين أعطت تقنية IRAP تعددية شكلية بمعدل 74.4 %.

2-أظهرت تقنية SSR أعلى درجة تشابه وراثية بين الصنفين الوزري و البلدي الحبي (0.69) و أقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي و العجمي (0.27)، في حين أظهرت تقنية IRAP أعلى درجة تشابه وراثية بين الطرازين K4 وK5 (0.78) وأقل درجة تشابه وراثية بين الصنفين البلدي الماوردي والوزري (0.55).

3-عزل التحليل العنقودي في كلا التقنيتين الصنفين البلدي الماوردي والعجمي كل على حده عن بقية الأصناف والطرز المدروسة.

4-تم وسم خمسة من الأصناف والطرز المدروسة بأربعة عشر واسم فريد عند استخدام تقنية SSR ، وأربعة من الطرز الوراثية الخمس من المشمش الكلابي وجميع الأصناف المدروسة بـ 35 واسم فريد عند استخدام تقنية IRAP .

5-إن التعددية الشكلية الجيدة لمعلّمات SSR(92.3%) و القيمة المرتفعة لمتوسط عدد الأليلات في الموقع 3 ومتوسط التغاير المورثي المتوقع 0.48 تؤكد جميعها أن تقنية SSR هي الأداة الأكثر ملاءمة لتعريف أصناف المشمش وهو يعكس قدرة معلّمات SSR على تأمين أنماط وراثية فريدة لكل طراز وراثي ولكل صنف.

6- سمحت قابلية الانتقال لمعلّمات SSR بين أنواع الجنس *Prunus* من استخدام المعلّمات المطورة من الدراق لدراسات التنوع الوراثي في المشمش إذ أن جميع أزواج المرئسات المستخدمة كانت قادرة على تضخيم مواقع SSR في المشمش ونسبة 84.6 منها كانت متعددة شكلياً وأظهرت هذه المواقع متوسط 2.8 أليل متعدد /موقع.

7- إن تماثل حجوم الأليلات مع الدراسات السابقة يثبت أن معلّمات SSRهي معلّمات محافظة (conservative) بين الأنواع (Cross-species) كما أنها تعكس المستوى العالي

من التشابه Homology بين المناطق المحيطة بمواقع التتابعـــات فـــي جينـــومي الـــدراق والمشمش.

8- تعد معلّمات IRAP من المعلّمات الجزيئية التي يعتمد عليها لأنها سهلة وســـريعة وذات تكلفة منخفضة نسبياً وهي تعطي معلومات إضافية في تقييم الجينوم و البصمة الوراثية.

9- إن درجة التعددية الشكلية العالية(74.4%) لنواتج التضخيم في تقنية IRAP والناتجة عن استخدام أزواج مرئسات مطورة بناءاً على العناصر النقالة في الشعير والموزمدهشة إذ يمكن أن يتوقع المرء أن العناصر النقالة ممكن أن لا تكون فعالة ونشطة بشكل كافي وثابتـــة بـــين جنسين مختلفين وبالتالي فانها لن تبدي أية تعددية شكلية مدخلة في الجينوم غير الأصلي مثل المشمش، ولقد أشار البحث الحالي إلى أن الأجناس النباتية المختلفة قد تتشارك بعائلات مـــن العناصر النقالة وهي فعالة وثابتة ويمكن أن تطبق مباشرة على الأجناس المختلفة.

10-إن تسجيل التكرارية العالية وثباتية النتائج لمعلّمات SSR وIRAPعند إعـــادة التجربـــة ولعدة مرات يزيد من موثوقية ومصداقية هاتين التقنيتين .

11-استطاعت كل من تقنيتي SSR وIRAP تمييز الأصناف والطرز المدروســـة بشـــكل واضح، وبالتالي إمكانية اعتماد هاتين التقنيتين في التوصيف الجزيئي للمشمش بهدف تعريف المصادر الوراثية المحلية ، وتقييم المجمعات الوراثية.

التوصيات:

1- تطوير معلّمات SSR من نوع واحد للجنس *Prunus* لإجراء التحاليل الوراثية اللازمة لكل الأنواع الأخرى التابعة لهذا الجنس. مما يقلل من التكلفة والوقت اللازمين لهذه العملية.

2- استخدام المعلّمات الوراثية المعتمدة على العناصر النقالة كأداة قيمة لمربي المشمش كما أن تواجد التكرارات الطرفية الطويلةLTR retrotransposon بوفرة في جينوم النبات يقترح أن استخدام هذه التقنية يسمح للمربين من إيجاد معلّمات فريدة مميزة ومرتبطة بالصفات الزراعية الهامة وهذا مما يمكن من استخدام هذه المعلّمات في برامج التربية بمساعدة المعلّمات (Marker assisted breeding) وانتخاب الغراس في المراحل المبكرة من النمو.

3- استخدام الواسمات الفريدة الناتجة عن تقنيتي SSR وIRAP في التوصيف النباتي لغراس وأشجار المشمش في المشاتل والمجمعات الوراثية وحقول المزارعين للتأكد من المدخلات الوراثية وتجنب عملية وجود نفس الطراز الوراثي تحت اسمين مختلفين في المجمع الوراثي بسبب اختلافات شكلية عائدة للعوامل البيئية فقط. وكذلك حصر الطرز الوراثية المهددة بالانقراض ومحاولة الحفاظ عليها في المجمعات الوراثية وإكثارها وإعادة نشرها في حقول المزارعين.

Abbreviations

AFLP	Amplification Fragment Length Polymorphism
AMOVA	Analysis of Molecular Variance
APS	Ammonium per sulfate
CTAB	Cetyltrimethyl ammonium bromide
DNA	Deoxyribonucleic acid
dNTPs	Deoxynucleotide tri phosphate(dCTP,dTTp,dATP,dGTP)
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
H_e	Expected Heterozygosity
H_o	Observed Heterozygosity
IRAP	Inter- Retrotransposon Amplified Polymorphism
ISSR	Inter-Simple Sequence Repeats
LTR	Long terminal repeat
PCOA	Principle Coordinate Analysis
PCR	Polymerase chain reaction
PVP	Polyvinyl pyrrolidon
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
REMAP	Retrotransposon-Microsatellite Polymorphism
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms
SSR	Simple Sequence Repeats
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TRIM	Terminal-repeat retrotransposon in miniature
UPGMA	Unweighted Pair Group Method using arithmetic Averages

الملحق (1)

الصنف	قوة النمو	لون البشرة الرئيسي	الألوان الإضافية	الصلابة	التصاق البذرة	طعم البذرة	شكل الثمرة
شكربارا	قوي	سمني	تخدد أحمر 25%	جيدة	منفصلة	حلو	دائري
التدمري	قوي	مشمشي	تخددأحمر	وسط	منفصلة	حلو	كروي
البلدي الماوردي	قوي	برتقالي	–	وسط	لاصقة	حلو	مسطح
البلدي الحبي	قوي	أصفر	أحمر 5%	وسط	منفصلة	حلو	مسطح
الوزري	متوسطة	أصفر	أحمر 12%	وسط	منفصلة	حلو	مسطح
العجمي		الأبيض المصفر	–	جيدة	منفصلة	حلو	مسطح

المراجع العربية

-الغماز، انتصار والريس، رفيق.(1992). دراسة عدد من أصناف المشمش المحلية والأجنبية في مركز بحوث حمص.منشورات وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.25 ص.

- الغماز، انتصار والمطر، إيمان.(2004). شـجرة المشـمش.منشـورات وزارة الزراعـة والإصلاح الزراعي.460.

-القطب، محمدعدنان وقطنا، هشام. (1988).الفاكهة متساقطة الأوراق.منشـورات جامعـة دمشق.383ص:222-264.

-المجموعة الإحصائية الزراعية السنوية (2008).وزارة الزراعة والإصلاح الزراعي.

- حامد، فيصل والعيسى، عماد.(1990) .الفاكهة انتاجهـا وتخزينهـا.منشـورات جامعـة دمشق.432 ص:8-7 .

المراجع الأجنبية

- Ahmad, R.; Potter, D. and Southwick, S.M. (2004). Identification and characterization of plum and pluot cultivars by microsatellite markers.The Jouالرنـl of Horticultural Science and Biotechnology. 79(1):164-169.

- Alavi-Kia, S.S.; Mohammadi, S.A.; Aharizad, S. and Moghaddam, M. (2008).Analysis of genetic diversity and phylogenetic relationships in Crocus genus of Iran using inter-retrotransposon amplified polymorphism. Biotechnol and Biotechnol.EQ:795-800.

- Amar, K.and Hirohika, H. (2001).Applications of retrotransposons as genetic tools in plant biology.Trends in Plant Sci.6:127-133.

- Ansorge, W. (1985).Silver staining of acrylamid gels.The Jouالرنl of Biochem and Biophys.Methods.11:13-20.

- Antonius-klemola, K.; Kalendar, R. and Sculman, A.H. (2006).Trim retrotransposon occure in apple and are polymorphic between varieties but not sports. Theoretical and Applied Genetics.112 (6): 999-1008.

- Aranzana, M.J; Garcia-Mas, J.; Carbo, J. and Aru`s, P. (2002). Development and variability analysis of microsatellite markers in peach. Plant Breeding. 121(1):87-92.

- Ashalatha, N.S.; Teo, C.H.; Schwarzacher, T.andHarrison, P.H.(2005). Genome classification of banana cultivars from south India using IRAP markers. Euphtica.144 (3):285-290.

- Badenes, M.L.; Asins, M.J.; Carbonell, E.A. and Glacer, G. (1996).Genetic diversity in apricot, *Prunus armeniaca* L. aimed at improvement of resistance to plum pox virus. Plant Breed.115:133-139.

- Barreneche, T.; Bodenes, C.; Lexer, C.; Trontin, J.F.; Fluch, S.; Streiff, R.; Plomion, C.; Roussel, G.; Steinkellner, H.; Burg, K.; Favre, J.M.; Glo¨ ssl, J. and Kremer, A.(1998). A genetic linkage map of *Quercus* robur L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, Microsatellite, isozyme and 5S rDNA markers. Theor. Appl. Genet. 97: 1090–1103.

- Bassam, B.J.; Caetano-Anolles, G. and Gresshoff, P.M. (1991).Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels.Anal.Biochem.196:80-83.

- Bassil, N.V.; Hummer, K.E. and Postman, J.D.(2006). Microsatellites are used to examine apple and pear identities and genetic relationships. Hort. Sci.41 (4):993.

- Battistini, S. and Sansavini, S. (1991).Electrophoretic analysis of isozyme variability in apricot germplasm. J.Genet. Breed.45:117-122.

- Baumel, A.; Ainouche, M.; Kalendar, R. and Schulman, A.H. (2002). Retrotransposon and genomic stability in populations of the young allopolyploid species *Spartina anglica* C.E Hubbard (*Poaceae*).Moleuclar Biology and Evolution.19 (8):1218-1227.

- Bouhadida, M.; Casas, A.M.; Moreno, M.A. and Gogorcena, Y. (2007). Molecular characterization of Miraflores variety and relatives using SSRs. Scientia Horticultrae.111:140-145.

- Bowley, S. (2004). SR9124.Application of SSR markers for DNA fingerprinting of *prunus* and *fragaria* varieties. Ministry of Agriculture, Food and Rural Affairs.

- Branco, C.J.S.; Vieira, E.A.; Malone, G.; Kopp, M.M.; Malone, E.Beلرrdes, A.; Mistura, C.C.; Carvalho, F.I.F.and Oliveira, C.A. (2007).IRAP and REMAP assessments of genetic similarity in rice. Appl. Genet.48 (2):107-113.

- Breto`, M.P.; Ruiz, C.; Pina, J.A.and Asins, M.J. (2002).The diversification of Citrus clementina, a vegetatively propagated crop species. Molecular Phylogenetics and Evolution. 21:285-293.

- Byrne, D.H. and Littleton, T.G. (1989).Characterization of isozyme variability in apricots.J.Am.Soc.Hort.Sci.126:205-209.

- Canli, F.A. (2004).Development of a second generation genetic linkage map for sour cherry using SSR markers. Pakistan Jouلـــزاll of Biological Sciences.7:1676-1683.

- Cardle, L.; Ramsay, L.; Milbourne, D.; Macaulay, M.; Marshall, D. and Waugh, R. (2000). Computational and experimental characterisation of physically clustered simple sequence repeats in plants. Genetics, 156: 847-854.

- Cipriani, G.; Lot, G.; Huang, W-G.; Marazzo, MT.; Peterlunger, E.and Testolin, R. (1999). AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in Prunus. Theor. Appl .Genet 99:65–72.

- Clarke, J.B and Tobutt, K.R. (2003).Development and characterization of polymorphic microsatellites from *prunus avium* `Napoleon`. Molecular Ecology Notes.3: 578-580.

- Darius, G. (2005).Transposon Insertion polymorphism as a new source of molecular markers. Jouلـــزاll of Fruit and Oلـــزاllmental Plant Research. 14: 21-29.

- Dirlewanger, E.; Cosson, P.; Tavaud, M.; Aranzana, M.J.; Poizat, C.; Zanetto, A.; Aru`s, P. and Laigret, F.(2002a). Development of microsatellite markers in peach (*prunus persica*L. Batsch) and their use in genetic diversity analysis in peach and sweet cherry (*prunus avium* L.). Theoretical and Applied Genetics.105: 127-138.

- Dirlewanger,E.; Cosson,P.; Tavaud,M.; Poizat,C.; Moing,A.; Zanetto,A.; Aranzana,M.J. and Aru`s,P.(2002b).Development of peach SSRs and their use in fingerprinting peach and sweet cherry cultivars.ISHS Acta Horticulturae.592:V Inteلـــزاltional Peach Symposium.

- Dirlewanger, E.; Graziano, E.; Joobeur, T.; Garriag-Caldere, F.; Cosson, P.; Howad, W. and Aru's, P. (2004).Comparative mapping and marker-assisted selection in Rosaceae crops. PNAS.101 (26):9891-9896.

- FAO stat. (2007).Food and Agriculture Organization of the United Nations.Rome.Italy.

- Fideghelli, C.; Della Strada, G.; Grassi, F.; Sartori, A. and Vitellozzi, A. (1999).Il patrimonio genetico della specie *Prunus armeniaca* in Italia. Italus. Hortus. 6: 37-38.

- Flavell, R.B.; Rimpau, J.andSmith, D.B. (1977).Repeated sequence DNA relationshipsin four cereal genomes.Chromosoma.63:205-222.

- Flavell, A.J.; Dunbar, E.; Anderson, R.; Pearce, S.R.; Hartley, R.and Ku-mar, A.(1992).Ty1-copia group retrotransposons are ubiquitous and heterogeneous in higher plants.Nucl.Acids.Res.20:3639-3644.

- Foroni, I.; Bencivenni, M. and Rao, R. (2006). Study of genetic diversity in apricot (*prunus armeniaca*) using simple sequencing repeats. Proceeding of the 50th Italian Societ of Agricultural Annual Congress.ISBN.88.

- Gomez, M. P.; Sanchez-Perez, R.; Rubio, M.; Dicenta, F.; Gradziel, T.M. and Sozzi, G.O. (2005). Application of recent biotechnologies to *prunus* tree crop genetic improvement. Cien.Inv.Agr.32 (2):73-96.

- Grzebelus, D. (2006).Transposon insertion polymorphism as a new source of molecular marker. Jouلنرال of Fruit and Oلنرalmental Plant Research.14:1-29.

- Guerriero, R.; Moteleone, P.; D'onofrio, C.; Ruiz, C.; Asins, M.J. and Carbonel, E.A. (2006). Characterisation of Italian apricot germplasm by phenotypic and microsatellite markers. ISHS Acta horticulturae.717: XIII Inteلـــنرaltional Symposium on Apricot Breeding and Culture .

- Guo, D.; Zhang, H. and Luo, Z. (2005).Genetic relationships of *Diospyros kakai* thumb. and related species revealed by IRAP and REMAP analysis. Plant Science. 170:528-533.

- Gupta, P.K. and Varshney, R.K. (2000).The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Euphytica. 113:163-185.

- Hammer, O.; Harper, D.A.T. and Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological statistices software package for education and data analysis.Palaeontologia Electronica.4 (1):9pp. http://palaeo-electronica.org/2001/past/issue1 01.htm

- Häkkinen, M.; Teo, C.H. and Othman, Y.R. (2007).Genome constitution for *Musa beccarii* (Musaceae) varieties. Acta Phytotaxonomica Sinica. 45(1):69-74.

- Hirochika, H. (2001).Contribution of the *Tos17* retrotransposon to rice functional genomics.Curr.Op.Plant Biol.4:118-122.

- Hokanson, S.C.; Szewc-McFadden, A.k.; Lamboy, W.F.; McFerson , JR.(1998). Microsatellite (SSR) markers reveal genetic identities, genetic diversity and relationships in a *Malus* × *domestica* Borkh. Core subset collection. Theor. Appl. Genet. 97:671–683.

- Hormaza, J.I. (1998).Early selection in cherry combining RAPDs with embryo culture.Scientia Horticulturae.79:121-126.

- Hormaza, J.I. (2002).Molecular characterization and similarity relationships among apricot (*Prunus armeniaca* L.) genotypes using simple sequence repeats. Theoretical and Applied Genetics.104: 321-328.

- Huang, W.G.; Cipriani, G.; Morgante, M. and Testolin, R. (1998). Microsatellite DNA in *Actinidia chinensis*: isolation, characterization, and homology in related species .Theor .Appl. Genet .97:1269-1278.

- Jaccard, P. (1908).Nouvelles recherches sur la distribution flora. Bull .Sac.Nat.44:223-270.

- Kahl, G. (2001).The Dictionary of Gene Technology. Wiley-VCH.Weinheim.

- Kalendar, R.; Grob, T.; Regina, M.; Suoniemi, A. and Schulman, AH. (1999). IRAP and REMAP: Two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques. Theor. Appl .Genet. 98: 704-711.

- Karp, A.; Seberg, O. and Buatti, M. (1996).Molecular techniques in the assessment of botanical diversity .Ann.Bot.78:143-149.

- Kimura,T.; Ban,Y.; Yamamoto,T.; Shi, Y.Z.; Kotobuki, K.; Matsta, N. and Hayashi, T.(2002).The Japanese pear genome program I. development of SSR markers and identification of pears. Acta Horticulturae 587:237-241.

- Lightbourn, G. and Veilleux,R.(2002). Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato. ISHS Acta Horticulturae.619.

- Liu, K.; Muse, S.V.(2005).Power Marker:An integrated analysis environment for genetic maker analysis.Bioinformatic.21(9):2128.

- Lopes, M.; Sefck, S.M.; Laimer, M. and Camara machado, A. (2002). Identification of Microsatellite loci in apricot. Molecular Ecology Notes. 2: 24-26.

- Maghuly, F.; Borroto Feـــنالndez, E.; Laimer, M.; Ruthner, S.; Bisztray, G.D. and Pedryc, A.(2005).Microsatellite characterization of apricot (*prunus armeniaca L.*) cultivars grown in central Europe. ISHS Acta Horticulturae .717: XIII Inteـــنالtional Symposium on Apricot Breeding and Culture: 207-212.

- Maghuly, F.; Borroto Feـــنالndez, E.; Zegler, R. Marschall, K.; Katinger, H. and Laimer, M. (2008).Genetic differentiation of

apricot (*prunus armeniaca L.*) cultivars with SSR markers. European Jouلنرال of Horticultural Science.73.

- McClintock, B. (1948).Mutable loci in maize. Carnegie Inst. Wash. Yearbook.47:155-169.

- Messina, R; Lain, O.; Marrazzo, M.T.; Huang, W-G.; Cipriani, G. and Testolin, R. (2003).Isolation of microsatellites from almond and apricot genomic libraries and testing for their transportability across different prunus species. ISHS Acta Horticulturae.663: XI Eucarple Symposium of Fruit Breeding &Genetics.

- Messina, R; Lain, O.; Marrazzo, M.T.; Cipriani, G. and Testolin, R. (2004).new set of microsatellite loci isolated in apricot. Mol.Ecol.Notes.4: 432-434.

- Mnejja, M.; Garcia-Mas, J.; Howad, W.; Bandeness, M.L.and Aru`s, P. (2003). Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*prunus salicina* Lind L.) are highly polymorphic and transferableto peach and almond. Molecular Ecology Notes.4:163-166.

- Mnejja, M.; Garcia-Mas, J.; Howad, W. and Aru`s, P. (2005). Development and transportability across *prunus* species of 42 polymorphic almond microsatellites. Molecular Ecology Notes.5 (3): 531-535.

- Muhammad, A.J.and Othman,Y.(2005).characterization of fusarium wilt-resistant and fusarium wilt-susceptible somaclones of banana cultivars rastali (*Musa* AAB) by Random Amplified Polymorphic DNA and retrotransposon markers. Plant Molecular Biology Reporter.241-249.

- Nakatsuka, A.; IWami, N.; Matsumoto, S.Itamura, H.andYamagishi, M. (2002).Ty1-copia group retrotransposon in persimmon (*Diospyros kakai* Thunb).Genes.Gent.Syst.77:131-136.

- Ohta, S.; Katsuki, T.; Tanaka, T.; Hayashi, T.; Soto, Y. and Yamamoto, T. (2005).Genetic variation in flowering cherries (*prunus* subgenus *cerasus*) characterized by SSR markers.Breeding Science.55 (4):415-424.

- Orgel, L.E.; and Crick, F.H.C. (1980).Selfish DNA: the ultimate parasite.Nature.284:604-607.

- Pedryc, A.; Ruthner, S.Z.; Bisztray, Gy.D. and Laimer, M.(2004). Characterization of different apricot cultivars grown in Hungary with SSR markers. Inteنational Symposium on *In vitro* Culture and Horticultural Breeding.725:691-698.

- Pereira, H.S.; Bara`o, A.; Delgado, M.; Morais-cecilio, L.and Viegas, W. (2005).Genome analysis of Grapevine retrotransposon (Gret1) in *Vitis vinifera*. Theoretical and Applied Genetics. 111(5):871-878.

- Powell, W.; Morgante, M.; Andre, C.; Hanafey, M.; Vogel, J.; Tingley, S. and Rafalski, A. (1996). The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. Mol. Breed. 2: 225–238.

- Price, Z.; Dumortier, F. and Mayes, S. (2002).Development and application of IRAP (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism) based on copia like retrotransposon in african oil palm (Elaeis guineensis JaCQ).

- Price, Z.; Shulman, A.H.and Mayes, S. (2003).Development of new marker methods-an example from oil palm. Plant Genetics Res.1:103-113.

- Rajapakse, S. (2003).Progress in application of molecular markers to genetic improvement of horticultural crops. Acta Horticultural 625:29-36.

- Regner, F.; Kickenweiz, M.and Hack, R. (2004).Genotyping apricots (*Prunus armeniaca* L.) by SSR markers .Mitteilungen Klosterneuburg. 54:33-42.

- Ricciardi, L.; Giorgio, V.; DEGiovanni,C.;Lotti,C.;Gallotta,A.and Fanizza,G.(2002).The genetic of apulian apricot genotypes (*prunus armeniaca L*) assessed using AFLP markers.Cellular & Molecular Biology Letters. 7:431-436.

- Romero, C.; Muñoz, V.; Lláce, G. and Badenes, M.L. (2003). Genetic diversity of different apricot geographical groups determined by SSR markers. Genome 46: 244–252.

- Ruthner,S.Z.; Pedryc,A.; Kriska,B.; Romero,C. and Badenes,M.L.(2006).Molecular characterization of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars using cross species SSR amplification with peach primers. Inteلرltional Jouلـزll of Horticultural Science.12 (3): 53-57.

- Sanchez-Perez, R.; Ruiz, D.; Dicenta, F.; Egea, J. and Martinz-Gomez, P. (2005a).SSR based genetic diversity assessment among apricot cultivars and breeding lines, and its relationship with agronomic traits. Acta Horticulturae (ISHS).717.

- Sanchez-Peres, R.; Ruiz, D.; Dicenta, F.; Egea, J. and Martınez-Gomez, P. (2005b). Application of simple sequence repeat (SSR) markers in apricot breeding: molecular characterization, protection, and genetic relationships. Sci. Hort. 103(3): 305-315.

- SanMinguel, P.; Tikhonov, A.; Jin,Y.K.; Motchoulskaia, N.; Zakharov, D.and Melake-Berhan, A.(1996).Nested retrotransposon in the intergenic regions of the maize genome.Science.274:765-768.

- Sosinski, B.; Gannavarapu, M.; Hager, L.D.; Beck, L.E.; King, G.J.; Ryder, C.D.; Rajapakse,S.; Baird, M.V.; Ballard, R.E. and Abbott, A.G.(2000). Characterization of microsatellite markers in peach (*prunus persica*L. Batsch). Theoretical and Applied Genetics.101: 421-428.

- Tautz, D.and Rentz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eucariotic genomes. Nature. 322: 652-656.

- Tautz, D. (1989). Hyper variability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res.17:6463-6471.

- Tao,S.;HanBo,Z.;HuaSun,D.;ZongJu,L.;LiZhong,C.;ZhiWei,Z.and YaPing,Z.(2007).Genetic diversity of *Tricholoma matsutake* in Yunnan province. Chinese Science Bulletin.52 (9):1212-1216.

- Teo,C.H.; Tan,S.H.; Ho,C.L.; Faridah,Q.Z.; Othman,Y.R.; Heslop-Harrison,J.S.; Kalendar,R. and Schulman,A.H.(2005).Genome constitution and classification using retrotransposon-based markers in the orphan crop banana. Jouلترال of Plant Biology.48 (1):96-105.

- Testolin ,R.; Marrazzo, T.; Cipriani, G.; Quarta, R.; Verde, I.; Dettori, M.T.; Pancaldi, M. and Sansavini, S.(2000). Microsatellite DNA in peach *Prunus persica L.* Batsch and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. Genome. 43: 512–520.

- Testolin,R.; Marrazzo,T. and Cipriani,G.(2002).Cross-species amplification of microsatellite markers isolated from peach by means of heterologous primer pairs .ISHS.538.

- Testolin, R.; Messina, R.; Lain, O.; Marrazzo, M.T.; Huang, W-G. and Cipriani,G.(2004). Microsatellites isolated in almond from an AC-repeat enriched library. Mol.Ecol.Notes.4: 459-461.

- Tian-Ming, He.; Xue-Sen, C.; Zheng, Xu.; Jiang-Sheng, Gao.; Pei-Jun, Lin.; Wen, Liu.; Qing, Liang and Yan,Wu.(2007). Using SSR markers to determine the population genetic structure of wild apricot (*Prunus armeniaca L.*) in the Ily Valley of West China. Genetic Resources and Crop Evolution .54: 563–572.

- Varasano, E.; Porceddu, A.; Lanfaloni, L.andBaldoni, L. (2002).Fingerprinting cherry CVs by a retrotransposon based molecular markers .ISBN.88.

- Vitte, C.andPanaud, O. (2005).LTR retrotransposonand flowering plant genome size: emergence of the increase/decrease model.Cytogenet Genome Res.110:91-107.

- Wang, Y.; Georgi, L.L.; Zhebentyayeva, T.N.; Reighard, G.L.; Scorza, R. and Abbott, A.G. (2002). High-throughput targeted SSR marker development in peach (*prunus persica*). Genome.45: 319-328.

- Waugh, R.McLean, K.Flavell, A.J.; Pearce, S.R.; Kumar, A.; Thomas, B.B.T.and Powell,W. (1997).Genetic distribution of Bare-1-like retrtotransposon elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms(S-SAP).Mol.Gen .Genet.253:687-694.

- Wessler, S.R.; Bureau, T.E. and White, S.E. (1995).LTR-retrotransposons and MITEs: important players in the evolution of plant genomes.Curr.Opin.Genet.Dev.5:814-821.

- Wunsch, A.and Hormaza, J.I. (2002).Molecular characterization of sweet cherry (*prunus avium* L.) genotypes using peach (*prunus persica* L.Batsch) SSR sequences.Heridity.89 (1):56-63.

- Yamamoto, T.; Mochida, K.; Lmai, T.; Haji, T.; Yaegaki, H.; Yamaguchi, M.; Matsuta, N.; Ogiwara, I. and Hayashi, T. (2003). Parentage analysis in japanese peaches using SSR markers. Breeding Science.53: 35-40.

- Yamamoto, T.; Kimura, T.; Soejima, J.; Sanada, T.; Ban, Y. and Hayashi, T. (2004). Identification of quince varieties using SSR markers developed from pear and apple. Breeding Science, vol.54 (3):239-244.

- Yannic, G.; Baumel, A. and Ainouche, M. (2004).Uniformity of the nuclear and chloroplast genomes of *Spartina martima* (*Poaceae*), a salt-marsch species in decline along the western European coast.Heredity.93:182-188.

- Zhang, Q.; Yan, G.; Dai, H.; Zhang, X.; Li, C.and Zhang, Z. (2008). Characterizaion of Tomentosa cherry (*prunus tomentosa* Thunb.) gonotypes using SSR markers and morphological traits. Scientia Horticulturae.118: 39-47.

- Zhebentyayeva , T.N.; Reighard, G.L.; Gorina ,V.M. and Abbott, A.G.(2003). Simple sequence repeats (SSR) analysis for

ABSTRACT

This investigation was carried out in The General Commission of Scientific Agricultural Research, Department of Biotechnology and in Damascus University, Faculty of Agriculture, Department of Horticulture Science. The aim of the study was to determine the genetic relationships among six of apricot cultivars: Shukrbara, Tadmori, Baladi Mawrdi, Baladi Habi, Wzri, Ajami in addition to five genotypes of Alklabi rootstock K1, K2, K3, K4, K5 .Tow PCR-based techniques were utilized in this study namely SSR and IRAP markers. For SSR, 26 primer pairs flanking microsatellite sequences (developed from Peach genomic library) were assayed, and for IRAP 33 primer pairs of the retrotransposon elements(developed from Barely and Banana).

SSR results showed that 22 primer pairs gave high efficiency in revealing the genetic diversity among the studied cultivars and genotypes. The Polymorphism percentage was 92.3% and a total of 78 alleles were detected with a mean value of 3 alleles/locus. The mean value of the expected heterozygosity was 0.48 and the observed heterozygosity was 0.29. The IRAP results showed that 32 primer pairs gave high efficiency in revealing the genetic diversity among the studied cultivars and genotypes. The Polymorphism percentage was 74.4%.

SSR analysis showed maximum genetic relationship between the two varieties Wzri and Baladi Habi (0.69) and minimum relationship between the two varieties Baladi Mawrdi and Ajami (0.27), with the mean value of genetic relationship of 0.48 among all studied varieties and genotypes. Furthermore, IRAP technique showed maximum genetic relationship between K4 and K5 genotypes (0.78) and minimum relationship between Baladi Mawrdi and Wzri varieties (0.55) with the mean value of genetic relationship of 0.67 among all studied genotypes.

The cluster analysis based on SSR results grouped the studied apricot varieties and genotypes into two main clusters at 0.43 similarity degree with the two varieties Baladi Mawrdi and Ajami separated away independently from both clusters and the genotype Ajami remained distinguished from all studied genotypes. The first cluster contained six varieties distributed to two sub-clusters, first sub-cluster contained two varieties Baladi Habi and Wzri in addition to two genotypes K1 and K3. The second sub-cluster contained the variety Tadmori with the genotype K2, and the second main cluster contained both genotypes K4 and K5 along with variety Shukrbara.

The cluster analysis based on IRAP results grouped the studied apricot varieties and genotypes into two main clusters at 0.67 similarity degree with the genotype K1 and Ajami variety separated away independently from both clusters and the genotype Baladi Mawrdi remained distinguished from all studied genotypes. The first cluster contained six varieties distributed to two sub-clusters, first sub-cluster contained two varieties Baladi Habi and Wzri, meanwhile the second sub-cluster contained the variety Tadmori with the genotype K3 and the variety Shukrbara with the genotype K2 independently, and the second main cluster contained both genotypes K4 and K5.

Nine primer pairs in SSR technique could mark some studied varieties and genotypes with 14 unique alleles with the variety Ajami having largest number of unique alleles (5 alleles), meanwhile IRAP technique could distinguish four out of the five Alklabi apricot genotypes and all studied varieties with 35 unique alleles with the variety Baladi Mawrdi having maximum number of unique markers (10 markers).

Both SSR and IRAP techniques confirmed high efficiency in detection of genetic diversity among studied varieties and genotypes and also its distinguishing with unique markers and hence ability of using both techniques in molecular characterization of apricot and evaluation of gene pools and for accelerating breeding programmes.